

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Vývoj metody relativní kvantifikace mRNA genu *HMOX1*
v různých tkáních prasete domácího s využitím
termocyklieru LightCycler® Nano (Roche)**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Denisa Lehnerová

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vývoj metody relativní kvantifikace mRNA genu *HMOX1* v různých tkáních prasete domácího s využitím termocyklieru LightCycler® Nano (Roche)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za odborné vedení, cenné rady a pomoc při laborním výzkumu a hodnocení výsledků. Dále bych ráda poděkovala Ing. Daniele Čílové a Mgr. Martině Melounové, Ph.D. za pomoc v laboratoři, za cenné připomínky a rady. Ráda bych také poděkovala Ing. Mgr. Tereze Krejčové a celému jejímu týmu Katedry veterinárních disciplín FAPPZ ČZU v Praze za získání vzorků pro moji diplomovou práci.

Mé děkuji také patří rodině, která mě nepřetržitě podporovala v mém studiu a plnění mých snů.

Vývoj metody relativní kvantifikace mRNA genu *HMOX1* v různých tkáních prasete domácího s využitím termocykleru LightCycler® Nano (Roche)

Souhrn

Diplomová práce na téma "Vývoj metody relativní kvantifikace mRNA genu *HMOX1* v různých tkáních prasete domácího s využitím termocykleru LightCycler® Nano (Roche)" se skládá ze dvou hlavních částí. Literární rešerší a experimentální částí, která byla provedena na Katedře genetiky a šlechtění ve spolupráci s Katedrou veterinárních disciplín na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze.

Literární rešerše se zabývá popisem genu *HMOX1*, jeho strukturou a regulací a dále je zde popsán produkt tohoto genu, protein hem oxygenáza, která je detailně popsána z hlediska její struktury a funkce. Z literární rešerše vyplývá, že gen *HMOX1* a hem oxygenáza hrají mnoho důležitých rolí v těle. Mezi hlavní patří degradace hemu, jehož produkty (oxid uhelnatý, železo, biliverdin) mají své další funkce.

Je zde vytvořen souhrn metod, které zkoumají expresi genů a hodnotí ji. Existuje mnoho takových metod, ale v této diplomové práci jsou popsány jen ty, které jsou nejznámější anebo používané v experimentální části této práce.

Experimentální část je zaměřena na optimalizaci vybrané metody při použití přístroje LightCycler® Nano od firmy Roche. Začíná izolací totální RNA, přepisem RNA pomocí reverzní transkriptázy na cDNA a bioinformatickou analýzou primerů, které byly následně použity při samotné qRT-PCR. Pro analýzu a získání hodnot Ratio ΔCq byl použit housekeepingový gen pro ribozomální protein L4.

Z výsledků vyplývá, že gen *HMOX1* se exprimoval v různých mírách ve všech získaných tkáních a nejvyšší expresi vykazovala slezina. Zde probíhá rozklad hemu, ke kterému je nutný enzym hem oxygenáza, produkt genu *HMOX1*. Byla detekována mRNA genu *HMOX1* ve dvou vzorcích oocytů, které obsahovaly různý počet buněk. Bylo zjištěno, že mezi plemenem Duroc a Bílé ušlechtilé existuje rozdíl v pozici nasedání navrženého reversového primeru *HMOX1* D, kde byl objeven SNP. Také bylo potvrzeno, že transkript genu *HMOX1*-202 získaný z databáze Ensembl je správný ve srovnání s transkriptem *HMOX1*-201, kterému chybí prodloužená 5'UTR oblast. Přítomnost této oblasti v transkriptu genu byl potvrzen použitím primerů vložených do této oblasti a jejich specifickou amplifikací.

Navržená metoda a použité postupy byly vhodné a dostatečně citlivé k detekci nízkých koncentrací cDNA ve vzorcích, a tak může být vytvořený protokol použit pro další genetický výzkum.

Řešení diplomové práce bylo podpořeno projekty GA FAPPZ Studium genetiky podmíněných vlastností s využitím molekulárně – genetických, bioinformatických a statistických metod (SV20-9-21360) a Molekulární analýza nukleových kyselin rostlin a živočichů a možnosti jejího hodnocení s využitím metod bioinformatiky a biostatistiky (SV19-07-21360).

Klíčová slova: *Sus scrofa*, gen *HMOX1*, hem oxygenáza, exprese genu, PCR, qRT-PCR

Development of a method for relative quantification of *HMOXI* gene mRNA in various tissues of domestic pig using LightCycler® Nano (Roche) thermocycler

Summary

The diploma thesis named "Development of a method for relative quantification of *HMOXI* gene mRNA in various tissues of domestic pig using the LightCycler® Nano (Roche) thermocycler" consists of two main parts. Literary research and experimental part, which was performed at the Department of Genetics and Breeding in cooperation with the Department of Veterinary Disciplines on Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences in Prague.

The literature research deals with the description of the *HMOXI* gene, its structure and regulation, and also describes in detail the product of this gene, protein heme oxygenase, which is described in detail in terms of its structure and function. The literature research shows, that the *HMOXI* gene and heme oxygenase play many important roles in the body. The main ones include the degradation of heme, whose products (carbon monoxide, iron, biliverdin) have their other functions. There is a summary of methods, that examine gene expression and evaluate it. There are many such methods, but only those, that are best known or used in the experimental part of this thesis are described in this diploma thesis.

The experimental part is focused on the optimization of the selected method using the LightCycler® Nano device from Roche. It begins with the isolation of total RNA, the transcription of RNA by reverse transcriptase into cDNA, and the bioinformatics analysis of primers, which were subsequently used in qRT-PCR alone. The housekeeping gene for the L4 ribosomal protein was used to analyze and obtain Ratio ΔCq values.

The results show that the *HMOXI* gene was expressed to varying degrees in all tissues obtained, and the spleen showed the highest expression, where the heme, which requires the enzyme heme oxygenase, the product of the *HMOXI* gene, is degraded. mRNA of *HMOXI* gene was detected in two oocyte samples containing different numbers of cells. It was found that between the Duroc and White Noble breeds there is a difference in the annealing position of the proposed reverse primer *HMOXI* D, where the SNP was discovered. It was also confirmed that the *HMOXI*-202 gene transcript obtained from the Ensembl database is correct compared to the *HMOXI*-201 transcript, which lacks the extended 5'UTR region. The presence of this region in the gene transcript was confirmed using primers inserted into this region and their specific amplification.

The proposed method and procedures used were suitable and sufficiently sensitive to detect low concentrations of cDNA in samples, so that the established protocol can be used for further genetic research.

The solution of the diploma thesis was supported by projects GA FAPPZ Study of genetics conditions using molecular genetic, bioinformatics and statistical methods (SV20-9-21360) and Molecular analysis of nucleic acids of plants and animals and the possibility of its evaluation using methods of bioinformatics and biostatistics (SV19-07-21360).

Keywords: *Sus scrofa*, *HMOXI* gene, heme oxygenase, gene expression, PCR, qRT-PCR

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotézy a cíle práce	2
2.1	Vědecké hypotézy	2
2.2	Cíle diplomové práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Prase domácí	3
3.1.1	Domestikace	3
3.1.2	Genom <i>Sus scrofa domestica</i>	4
3.1.3	Genetický model	5
3.2	Gen HMOX1	6
3.2.1	Struktura	6
3.2.2	Regulace exprese genu <i>HMOX1</i>	6
3.2.2.1	Faktory tepelného šoku	8
3.2.2.2	Bach1	9
3.2.2.3	Keap1/Nrf2	10
3.2.2.4	AP-1	12
3.2.2.5	NF-kB/Rel	14
3.2.3	Signální kaskády vedoucí k aktivaci genu <i>HMOX1</i>	15
3.2.3.1	MAPK signální cesta	16
3.2.3.2	PI3K/Akt signální cesta	19
3.2.3.3	JAK/ STAT signální cesta	20
3.3	Hem oxygenáza 1	22
3.3.1	Základní struktura	22
3.3.2	Izoformy	23
3.3.3	Posttranslační strukturální modifikace HO-1	24
3.3.3.1	Fosforylace	24
3.3.3.2	Palmitoylace	24
3.3.3.3	Acetylace	25
3.3.3.4	Ubikvitinace	25
3.3.3.5	Dimerizace a zkracování	26
3.3.4	Enzymatická aktivita hem oxygenázy- 1	26
3.3.4.1	Hem jako substrát pro funkci hem oxygenázy-1	26
3.3.5	Produkty aktivity hem oxygenázy-1	32
3.3.5.1	Železo	32
3.3.5.2	Oxid uhelnatý	33

3.3.5.3	Biliverdin a bilirubin	34
3.3.6	Funkční role HO-1	34
3.3.6.1	Role v reutilizaci železa	34
3.3.6.2	Neuroprotektivní role	35
3.3.6.3	Role v kardiovaskulárním systému	36
3.3.6.4	Role v ledvinách.....	36
3.3.6.5	Role v játrech	37
3.3.6.6	Role při karcinogenezi	39
3.3.6.7	Role v reprodukci a embryonálním vývoji.....	40
3.3.6.8	Role v angiogenezi	42
3.3.6.9	Protizánětlivá role	42
3.4	Metody pro analýzu exprese genů	44
3.4.1	Test rezistence k RNáze (RPA)	44
3.4.2	In situ hybridizace.....	45
3.4.3	Northern blotting	47
3.4.4	PCR.....	49
3.4.4.1	Historie	49
3.4.4.2	Optimalizace.....	49
3.4.4.3	Hot starts	50
3.4.4.4	Kontaminace.....	50
3.4.4.5	Průběh PCR.....	51
3.4.4.6	Analýza PCR produktu.....	52
3.4.4.7	Výhody a omezení PCR	53
3.4.5	qRT-PCR	54
3.4.5.1	Fáze real-time PCR	55
3.4.5.2	Možnosti kontroly	56
3.4.5.3	Detekce produktů qRT-PCR	57
3.4.5.4	Měření genové exprese.....	58
3.5	Expres genů při oogenezi a zrání oocytů.....	60
3.5.1	Genová exprese při PGC migraci a proliferaci.....	60
3.5.2	Genová exprese při formaci primordiálního folikulu	61
3.5.3	Genová exprese při aktivaci a vývoji folikulu	61
3.5.4	Genová exprese při dozrávání oocytů.....	62
3.5.5	Regulace translace v oocytech.....	64
4	Materiál a metodika	65
4.1	Použité tkáně	65
4.2	Izolace celkové RNA	66

4.3	Koncentrace a absorbance izolované RNA.....	67
4.4	Přepis RNA na cDNA	68
4.5	Navrhování a optimalizace primerů.....	69
4.6	Amplifikace vybraných oblastí cDNA genu <i>HMOX1</i>	72
4.7	Sekvenační analýza amplifikovaných qRT-PCR produktů	74
4.7.1	Purifikace PCR produktů.....	74
4.7.2	Příprava sekvenační reakce.....	74
4.7.3	Čištění produktů sekvenační reakce	75
4.8	Testování specifičnosti amplifikace pomocí analýzy teploty tání T_m	75
4.9	Zohlednění účinnosti primerů	76
4.10	Statistické zpracování výsledků	76
5	Výsledky.....	77
5.1	Koncentrace a absorbance izolované RNA.....	77
5.2	Testování navržených primerů	78
5.3	Řešení problému s párem primerů <i>HMOX1</i> DF/DR	79
5.4	Elektroforetický test všech tkání s vybranými primery <i>HMOX1</i> CF/CR a <i>RPL4</i> AF/AR	81
5.5	Vyhodnocení qRT-PCR.....	82
5.5.1	Účinnosti reakce pomocí standardní křivky	83
5.5.2	Specifita amplifikace pomocí vyhodnocení křivek tání	84
5.6	Ověření specifičnosti amplifikace sekvenováním.....	85
5.7	Přítomnost mRNA genu <i>HMOX1</i> v oocytech a ředění cDNA oocytů.....	85
5.8	Statistické šetření	87
5.8.1	Vstupní hodnoty ΔC_q pro statistické analýzy	87
5.8.2	Test normality a test homogenity rozptylu	87
5.8.3	GLM-Anova výsledky jednorozměrných testů významnosti	89
6	Diskuze.....	92
6.1	Vzorky tkání a oocyty	92
6.2	Izolace RNA a hodnocení její kvality	92
6.3	Reverzní transkripce.....	93
6.4	Primery	93
6.5	qRT-PCR a hodnocení ΔC_q	94
7	Závěr	97
8	Literatura	99
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	130
10	Samostatné přílohy	I
10.1	Sekvence genu <i>HMOX1</i> s vyznačenou pozicí primerových párů A-K	I

1 Úvod

Prase domácí (*Sus scrofa domestica*) je jedním z prvních domácích zvířat využívaných lidmi. Domestikace prasete začala před 9 000 lety a člověk využíval a postupně šlechtil prase pro získání obživy. Tento druh se vyskytuje po celém světě jak v divoké, tak v domestikované formě a za mnoho let jsme byli schopni vyšlechtit několik plemen využívaných jak pro lidskou obživu, tak jako domácího mazlíčka v miniaturní formě. Zásadní je však význam prasete jako genetického modelu pro člověka. Prase je fyziologicky velmi podobné člověku, a tak se dá experimentálně využít pro pochopení různých genetických či fyziologických onemocnění člověka.

Gen *HMOX1* je nezbytný pro tvorbu enzymu hem oxygenázy, která má mnoho životně důležitých funkcí v organismu. Gen je exprimován v různých tkáních a jeho exprese je složitě regulována přes signální kaskády aktivované různými stimuly, jako je například molekula hemu nebo oxidační stres. Gen *HMOX1* je u prasete prezentován dvěma transkripty, které tvoří stejný produkt, ale liší se délkou 5'UTR oblasti.

Hem oxygenáza hraje klíčovou roli v metabolismu hemu, ale má spoustu vedlejších funkcí, které vyplývají z funkce produktů degradace hemu, jako je oxid uhelnatý, železo a biliverdin. Například železo je využíváno pro tvorbu ATP, přenos kyslíku a detoxikaci a oxid uhelnatý funguje jako signální molekula pro mnoho buněčných procesů. Hem oxygenáza poskytuje mimo jiné i ochranu buněčných systémů díky biliverdinu, produktu degradace hemu s antioxidačními vlastnostmi.

Hem oxygenáza se vyskytuje ve třech izoformách HO-1, HO-2 a HO-3. Tato diplomová práce se zabývá expresí genu *HMOX1*, jehož exprese tvoří zatím nejvíce prostudovanou izoformu, hem oxygenázu 1 (HO-1).

Metoda používaná k hodnocení exprese genu začíná izolací totální mRNA a následuje převedení na cDNA pomocí reverzní transkriptázy. Pomocí samotné amplifikační PCR metody by bylo možné kvalitativně vyhodnotit množství fragmentů. Metody se však stále vyvíjí a postupem času bylo potřeba i kvantifikovat toto množství. Byla vyvinuta metoda nazývaná qRT-PCR, která se stala cenným nástrojem pro měření genové exprese. Tato metoda je založena na klasické PCR, ale využívá speciální nástroj (např. termocykler LightNano® Roche), který kontinuálně zaznamenává množství DNA v průběhu každého cyklu.

V této diplomové práci se snažíme optimalizovat metodu, která by byla vhodná a dostatečně citlivá pro kvantitativní vyhodnocování exprese genu *HMOX1* a tím poskytnout nové postupy pro následující studie.

2 Vědecká hypotézy a cíle práce

2.1 Vědecké hypotézy

Na začátku tvorby diplomové práce byly stanovené tyto vědecké hypotézy:

- Gen *HMOX1* je typický bazální expresí. Množství transkribované mRNA tohoto genu bude dostatečné pro detekci metodou qRT-PCR s využitím SYBR Green barviva (Roche).
- Lze předpokládat různou expresi v různých orgánech prasete (slezina, plíce, játra, děloha, srdce a vaječník). K nejvyšší relativní expresi by mělo docházet ve slezině, kde probíhá rozklad metaloporfyrinů.
- Oocyty jsou obecně považovány za transkripčně neaktivní. Pokud bude navržená metoda dostatečně citlivá, bude schopná detekovat v oocytech mRNA genu *HMOX1*, která byla transkribována v procesu jejich vzniku.

2.2 Cíle diplomové práce

Cíle diplomové práce vycházejí z uvedených hypotéz a jsou následující:

- Cílem práce je ověřit platnost výše uvedených hypotéz.
- Na základě studia vědecké literatury bude zpracována ucelená literární rešerše.
- Bude provedena bioinformatická analýza prasečího genu *HMOX1* s cílem identifikovat exonové oblasti a varianty sestříhu.
- Budou navrženy primerové páry umístěné v jednotlivých exonech genu *HMOX1* vhodné pro následné stanovení relativní exprese metodou qRT-PCR s využitím SYBR Green barviva (Roche).
- Bude vybrán vhodný "house keeping" gen.
- Bude provedeno statistické vyhodnocení výsledků.

3 Literární rešerše

3.1 Prase domácí

Prase domácí (*Sus scrofa domestica*) je jedním z nejvýznamnějších druhů hospodářských zvířat a stalo se hlavním lidským zdrojem výživy. Jeho divoký předek, prase divoké (*Sus scrofa*), sdílí mnoho znaků s prasetem domácím, ale liší se například délkou končetin nebo velikostí lebky (Albarella et al. 2006).

Prasata jsou nepřežvýkaví sudokopytníci patřící do řádu *Artiodactyla*, což je řád fylogeneticky blízko k primátům. Všechna prasata jsou členy čeledi *Suidae* a nacházejí se celosvětově v široké škále prostředí. V evolučních studiích je prase zajímavé nejen proto, že existují plemena prasat s velkými fenotypovými rozdíly v morfologii, fyziologii a behaviorálních rysech, ale také proto, že na světě jsou stále přítomni divocí předci domestikovaných prasat (Giuffra et al. 2000).

Prasata se mohou lišit od miniaturních plemen po velká plemena. V odvětví vepřového masa dominuje pouze šest plemen: Velké bílé (Yorkshire), Landrace, Duroc, Hampshire, Berkshire a Pietrain. Avšak pro experimentální účely se využívají hlavně miniaturní prasata, která lze udržovat v izolátorech (Butler & Sinkora 2007).

K rozlišování druhů *Sus* se používá mnoho metod, které se zaměřují na morfologii (hlavně zubů a lebky), na chování a reprodukční izolaci. *Sus scrofa* je zařazeno do velkého počtu poddruhů, ale přesný počet není známý. Je zatím možné rozlišit více než 16 různých poddruhů, z nichž každý zaujímá odlišné zeměpisné oblasti (Rischkowsky 2007).

Jako živočišný druh, se svými divokými předky přítomnými ve světě, poskytuje prase jedinečnou příležitost ke sledování vývojové historie savců a k definování selekce, která vyplývá z domestikace a přirozené selekce (Archibald et al. 2010).

Prase je také vhodným biomedicínským modelem pro člověka, především díky podobnosti v morfologii a fyziologii (Archibald et al. 2010).

3.1.1 Domestikace

Domestikace je proces genetické adaptace divokého biologického organismu tak, aby lépe vyhovoval potřebám člověka. Tento proces probíhá v důsledku životních a šlechtitelských podmínek a pod pečlivou kontrolou člověka po více generací (Darwin 1868).

Domestikace prasat byla nedílnou součástí vzestupu zemědělství a přijetí zemědělských praktik po celém světě. Prase domácí bylo domestikováno z divokého prasete *Sus scrofa* přibližně před 9 000 lety ve více regionech světa (Giuffra et al. 2000).

Podle zooarcheologického záznamu prase domácí pocházelo z blízkého východu a šířilo se na západ do Evropy a na východ Číny (Epstein et al. 1986). Avšak předběžný výzkum, využívající mitochondriální DNA (mtDNA) sekvence ze vzorků eurasijských divokých prasat a různých plemen domácích prasat, poskytl důkazy na podporu hypotézy, že docházelo k vícenásobné a nezávislé domestikaci (Kijas & Andersson 2001). Další data (Larson et al. 2005) z analýzy divokých a domácích prasat z Eurasie podporují hypotézu, že k domestikaci prasat došlo nezávisle na různých lokalitách v celé Eurasii (Čína, Thajsko, Indie, Island, Evropa). Další výsledky také naznačují, že *Sus scrofa* jako druh pocházel z ostrovů

v jihovýchodní Asii (Filipíny, Indonésie), odkud se rozšířil po celé Eurasii a dovozem farmáři se dostal do Evropy (Chen et al. 2007).

Domestikace poskytla rychlé fenotypové změny pomocí umělé selekce. Způsobila několik významných změn ve fyzických typech prasat. Například zmenšení velikosti kostry. Změny však mohou vyplynout i z environmentální rozmanitosti, jako jsou zdroje krmiv (Chen et al. 2007).

V současné době je na celém světě přibližně 731 plemen (plemenná a inbrední), z nichž dvě třetiny se vyskytují v Číně a Evropě. Více než 270 je považováno za ohrožené nebo kriticky ohrožené (Chen et al. 2007).

3.1.2 Genom *Sus scrofa domestica*

Sekvenování genomu prasete domácího bylo zahájeno zřízením konsorcia pro sekvenování genomu prasat (SGSC) v září roku 2003 (Schook et al. 2005). Strategie SGSC byla založena na hierarchickém Sangerově sekvenování a použitím umělých bakteriálních chromozomálních klonů (BAC – bacterial artificial chromosome). Následně byla data sekvenování doplněna novými sekvenačními daty pomocí metody Illumina (Archibald et al. 2010).

Výsledkem těchto snah bylo shromáždění a zveřejnění návrhu referenční genomové sekvence *Sus scrofa* v roce 2012. Kromě této referenční genomové sekvence, která byla odvozena od samice prasete plemene Duroc, SGSC popsala genomovou sekvenci dalších 48 prasat různých plemen a divokých prasat (Groenen et al. 2012). Od té doby byly resekvenovány genomy stovek jednotlivých prasat za účelem zkoumání variace, evoluce a selekce genomu u tohoto druhu a v současné době je veřejně k dispozici přibližně 350 úplných genomů (Groenen et al. 2012).

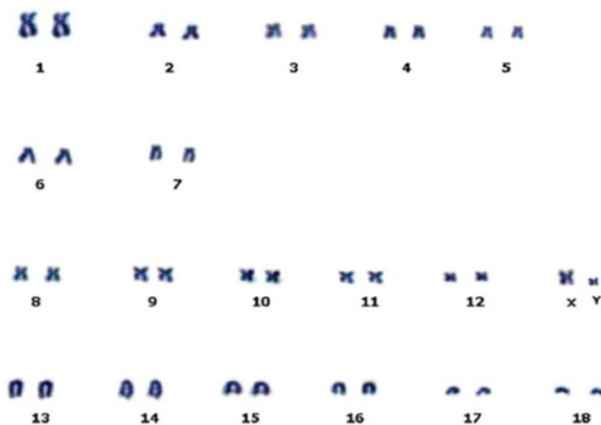
Genom prasete má chromozomové číslo $2n=38$ (36 autozomů a 2 pohlavní chromozomy) a velikost genomu je podobná člověku, přibližně 2,7 Gb. První pár chromozomů je nejdelším párem a třináctý pár je druhým největším, zatímco Y chromozom je nejmenší v karyotypu prasete. Průměrná relativní délka, poměr ramen, centromerické indexy a morfologické indexy chromozomů kolísají od $1,99 \pm 0,01$ do $11,23 \pm 0,09$, $1,04 \pm 0,05$ až $2,95 \pm 0,02$, $0,51 \pm 0,14$ až $0,75 \pm 0,09$ a $2,08 \pm 0,07$ až $8,08$. Pohlaví nemá významný účinek na studovaná morfometrická měření (Vishnu et al. 2015). Karyotyp prasete domácího je zobrazen na Obr. 1.

Prvních pět párů autozomů jsou submetacentrické, další dva páry subcentrometrické (6 a 7), následujících pět je metacentrických (8 až 12) a zbývajících šest párů je telocentrických (13 až 18), zatímco oba pohlavní chromosomy jsou metacentrické (Vishnu et al. 2015).

Kromě poskytnutí důležitých evolučních informací přispěla dostupnost celé genomové sekvence prasete k odhalení molekulárních mechanismů kontrolujících fenotypy (Archibald et al. 2010). Analýza prasečích sekvencí naznačila téměř totožný obsah genů jako u člověka, ačkoli byly identifikovány některé rozdíly v pořadí genů. Pokud jde o srovnání lidských,

myších a prasečích genomů, bylo mezi lidským a prasečím genomem zjištěno více podobností než mezi lidským a myším (Hart et al. 2007).

Dokončení sekvenací genomů různých organismů poskytuje výchozí bod pro pochopení složitosti genetiky a genetických variací přispívajících k různým znakům a onemocněním (Chen et al. 2007).



Obrázek 1 Karyotyp *Sus scrofa domestica* (Vishnu et al. 2015)

3.1.3 Genetický model

Domácí prasata úzce souvisejí s lidmi z hlediska anatomie, genetiky a fyziologie a představují vynikající zvířecí model. Experimenty na prasatech mnohem lépe predikují léčebné postupy u lidí než experimenty na hlodavcích. Výběr správného plemene a věku prasete umožňuje provádět různé chirurgické i nechirurgické postupy typické pro humánní medicínu, které nejsme schopni provést u mnoha jiných zvířecích modelů (Ibrahim et al. 2006).

Z hlediska genetiky je velikost a složení prasečího genomu srovnatelná s velikostí a složením u člověka (Hart et al. 2007). Prasata jsou také fyziologicky podobná lidem. Oba druhy jsou všežravé a jejich orgány obecně sdílejí společné funkční rysy (Swindle et al. 2011). Úspěšně se tak používají modely transplantace orgánů prasat na primáty (Ibrahim et al. 2006).

Během posledního desetiletí narůstal zájem o detekci genů a genomických oblastí u lidí a dalších organismů. Domácí živočišné druhy prošly silnými selektivními tlaky, které byly namířené proti genům nebo genomickým regionům, kontrolujícím znaky biologického, zemědělského nebo lékařského významu. Prasata nabízejí jedinečnou příležitost k identifikaci genů nebo genomických oblastí, kódujících kvantitativní lokusové znaky (QTL), protože prošly nedávnými a silnými selekcemi, zaměřenými na různé fenotypy. Prase je tedy i cenným biomedicínským modelem pro lidské zdraví (Archibald et al. 2010).

Používají se například inbrední miniaturní prasata, z nichž každé je homozygot pro odlišnou alelu hlavního lokusu histokompatibility (MHC). Jsou vyvinuty selektivním šlechtěním na základě tkáňové typizace potomků. Tato inbrední histokompatibilní prasata mohou být velice užitečná v experimentech (Schwartz et al. 2018).

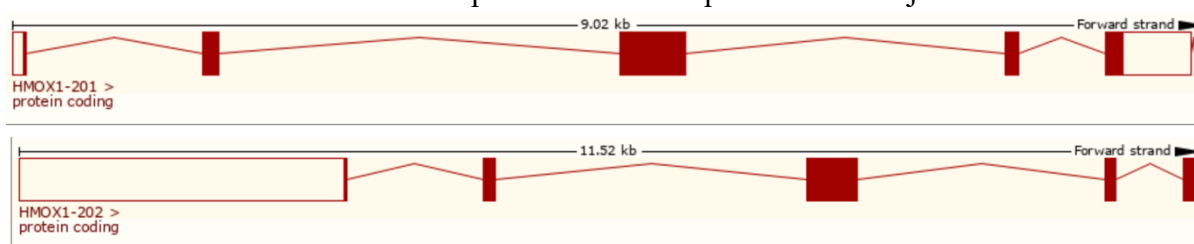
3.2 Gen *HMOX1*

3.2.1 Struktura

Struktura a umístění genu *HMOX1* závisí na konkrétním druhu.

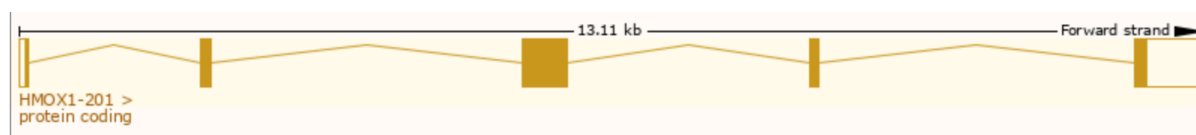
Prasečí gen *HMOX1* je lokalizován na chromozomu 5 (Warr et al. 2020) a skládá se ze 7 exonů a 6 intronů. Transkript genu *HMOX1-201* je velký 1527 bp a kóduje enzym hem oxygenázu 1 (HO-1) složenou z 287 aminokyselin. Existuje také druhý transkript genu *HMOX1-202*, dlouhý 4041 bp, který kóduje stejný enzym, ale jeho 5'UTR oblast (3177 bp) je delší na rozdíl od prvního transkriptu, kde je 5'UTR oblast dlouhá 88 bp (databáze Ensembl).

Rozložení exonů a intronů u prasete domácího plemene Duroc je zobrazeno na Obr. 2.



Obrázek 2 Zobrazení exonů a intronů ve dvou transkriptech genu *HMOX1* u prasete (Ensembl)

Lidský gen *HMOX1* obsahuje 5 exonů a 4 introny a jejich rozložení je zobrazeno na Obr. 3. Tento gen je lokalizován v oblasti 14 kb na chromosomu 22 a tvoří protein HO složený z 288 aminokyselin. Lidský *HMOX1* gen nemá typický TATA nebo CAAT box na 5' konci. Tato TATA sekvence je zde známa jako ATAAATG a je 21 bp upstream od místa iniciace transkripce (Loboda et al. 2008).



Obrázek 3 Zobrazení exonů a intronů v transkriptu genu *HMOX1* u člověka

Geny *HMOX1* obsahují potenciální element tepelného stresu HSE (heat shock element) v proximální části promotoru (Yoshida et al. 1988). Vedle HSE, *HMOX1* promotor obsahuje několik DNA responzivních elementů, které jsou specificky identifikované transkripčními faktory, které jsou aktivovány jako odpověď na oxidativní stres. Patří sem např. transkripční faktory Bach1, Nrf2, aktivační protein 1 (AP-1) a nukleární faktor NFκB. Distální regiony *HMOX1* promotoru jsou nezbytné pro indukci *HMOX1* hlavně hemem, těžkými kovy, peroxidem vodíku a arsenitanem sodným (Alam et al. 1995).

Analýza *HMOX1* genu u různých druhů zahrnujících prase, myš, potkana, slepici a člověka ukazuje variaci mezi jejich promotory (Loboda et al. 2008).

3.2.2 Regulace exprese genu *HMOX1*

HO-1, enzym omezující rychlost v hem katabolismu, hraje rozhodující roli v nejméně dvou důležitých fyziologických procesech: recyklace molekul železa, především ze stárnoucích erytrocytů a pro erythropoézu a udržování buněčné homeostázy ve stresových podmínkách. Silně

antioxidační, protizánětlivé a signální aktivity CO a žlučových pigmentů mohou být významně importovány v celé řadě lidských patologických stavů, včetně zánětlivých chorob, jako je sepse a astma, kardiovaskulárních chorob, jako je infarkt myokardu, ateroskleróza a hypertenze, ischemicko-reperfuční poškození a odmítnutí transplantátu. Funkční význam HO-1 závisí nejen na jeho vlastní enzymatické aktivitě, ale také na schopnosti buněk stimulovat HO-1 aktivitu prostřednictvím transkripční regulace genu *HMOX1*. Je nezbytné podrobné a důkladné pochopení mechanismů regulace genu *HMOX1* (Alam & Cook 2005).

Není jasné, kolik transkripčních faktorů je potřeba k aktivaci genu *HMOX1*. Expresi *HMOX1* totiž stimuluje mnoho patologických stavů a stresových efektorů, včetně hemu, UV záření, hypertemie, těžkých kovů, peroxidu vodíku, endotoxinů a zánětlivých cytokinů. Pro funkčnost a životaschopnost buňky je důležité, aby byly schopné komunikovat a reagovat na změny v jejich prostředí. Proto existuje značný počet signálních drah a transkripčních faktorů pro vhodnou reakci na konkrétní okolnosti. Je známo několik transkripčních faktorů, které jsou nejlépe prostudovány a jsou regulátory buněčné stresové reakce u obratlovců. Mezi tyto faktory patří například NFκB a AP-1. Určitý stimul může aktivovat členy více než jedné skupiny faktorů a existuje určité funkční překrývání mezi jednotlivými skupinami. Každý faktor reguluje různé aspekty buněčné stresové reakce, a proto je aktivován za různých okolností (Alam & Cook 2005).

Například NFκB je důležitým regulátorem cytokinů a dalších mediátorů imunitních a zánětlivých odpovědí, které poskytují ochranu před bakteriálními a virovými infekcemi. Nrf2 je aktivován různými xenobiotiky a oxidanty a reguluje geny kódující proteiny s antioxidačními a xenobiotickými detoxifikačními aktivitami. Faktory AP-1 regulují buněčný osud regulováním produkce proteinů, které zprostředkovávají buněčný růst nebo buněčnou smrt (Alam & Cook 2005).

Expresi *HMOX1* je primárně regulována na úrovni transkripce a bylo prokázáno, že mnoho regulačních prvků (RE) promotoru *HMOX1* zprostředkovává bazální a indukovatelnou expresi u různých druhů. Dvě upstream oblasti, které se nazývají E1 a E2, hrají hlavní funkční role pro redoxně závislou indukci *HMOX1*. Obě oblasti, zesilovače E1 a E2, obsahují několik prvků antioxidační odezvy (ARE), které byly také identifikovány v promotorech jiných antioxidačních a detoxikačních genů (Kagiya et al. 2009).

Důležitým rozdílem mezi geny *HMOX1* různých druhů je s velkým biologickým významem GT mikrosatelitní polymorfismus, který je lokalizován v proximální oblasti promotoru genu *HMOX1*. Nižší počty opakování GT v této polymorfní sekvenci byly spojeny s vyšší indukovatelností exprese *HMOX1* genu v reakci na stresové podněty a zdá se, že jedinci s touto alelou jsou chráněni před kardiovaskulárními poruchami (Paine et al. 2010).

Protože indukce *HMOX1* je známou strategií používanou buňkami k neutralizaci různých stresových stavů (Ryter et al. 2006), může být cílená indukce tohoto genu prospěšná terapeutická strategie proti různým onemocněním. Zejména identifikace necytotoxických induktorů *HMOX1* může představovat nový přístup k boji proti různým oxidačním a zánětlivým reakcím (Son et al. 2013).

V následujícím textu jsou popsány hlavní modulátory a transkripční faktory, které regulují indukci exprese genu *HMOX1* a ovlivňují tak funkci HO-1.

3.2.2.1 Faktory tepelného šoku

Charakterizace molekulárních mechanismů regulace *HMOX1* byla zahájena izolací a charakterizací potkaního genu v roce 1987 (Shibahara et al. 1987). Analýza primární struktury promotoru odhalila motiv velmi podobný heat shock elementu (HSE), který je nezbytný pro regulaci sady genů v reakci na hypertemii. Reakce na tepelný šok (HSR) je univerzální a evolučně konzervovaný biologický mechanismus, používaný organismy za nepříznivých okolností k zachování buněčných funkcí. Kromě zvýšené teploty může být HSR spuštěna jinými stresory (Pirkkala et al. 2001).

Charakteristickým znakem HSR je rychlá akumulace heat shock proteinů (HSP), které usnadňují syntézu a sestavování vznikajících proteinů, udržují je v jejich nativní složené formě, pomáhají při intracelulárním transportu proteinů a podporují proteolytickou degradaci nebo opravu chybně složených nebo stresem poškozených proteinů. Exprese HSP je regulována primárně na úrovni genové transkripce, což je proces řízený rodinou HSF sekvenčně specifických proteinů. U obratlovců byly identifikovány čtyři HSF, přičemž HSF3 je jedinečný pro ptačí linii. Hypertermií jsou aktivovány pouze HSF1 a HSF3 a jsou považovány za primární regulátory HSR (Pirkkala et al. 2001).

Práce Shibahary et al. (1987) vedla k neočekávanému zjištění, že myši a lidské HO-1 zjevně nejsou HSP. Tento závěr byl založen na pozorování, že hladiny HO-1 nebo mRNA nebyly ovlivněny zvýšenými teplotami v několika kultivovaných buněčných liniích. Jedinou přesvědčivou výjimkou je indukce HO-1, pozorovaná v jaterních buňkách Hep3B. Podobně je gen *HMOX1* u myši odolný vůči indukci tepelným šokem, s jedinou výjimkou buněčné linie odvozené z jater (Elia et al. 1999).

Vysvětlení tohoto jevu lze nalézt při porovnání sekvencí různých *HMOX1* promotorů. Potkaní *HMOX1* promotor obsahuje dva HSE, z nichž oba jsou vyžadovány pro optimální aktivaci hypertermií. Myši HSE1 se odchyluje od potkaního ortologu ve dvou polohách, z nichž jedna je substituce (G za A) v konzervovaném tripletu GAA. Není divu, že na rozdíl od analogické sekvence potkanů, není syntetická kopie lokusu myšního *HMOX1* HSE1/ HSE2 aktivována hypertermií (Alam & Cook 2006).

Lidský HSE2 se odchyluje od konsensu 5' nGAAn 3' na třech různých pozicích a nemusí to tedy být skutečný HSE, ani se nemusí vázat na HSF1. V důsledku toho, pokud aktivace tepelným šokem vyžaduje kooperaci mezi proteiny HSF1 navázanými na HSE1 a HSE2, je pravděpodobné, že lidský *HMOX1* také nebude reagovat nebo bude jen velmi slabě reagovat na hypertermii (Alam & Cook 2006).

Za indukci *HMOX1* v jaterních buňkách je zodpovědný distální HSE lokalizovaný v oblasti E1. Umístění funkční HSE v této vzdálenosti je neobvyklé, protože HSE klasických genů HSP jsou obvykle umístěny bezprostředně před začátkem transkripce. Odezva distálního HSE na tepelný šok může vyžadovat koordinaci HSF1 s dalších faktorů, což poskytuje jedno možné vysvětlení hypertermické indukce *HMOX1* pouze v omezeném počtu myších a lidských buněk (Elia et al. 1999).

Zatímco je role distálního HSE v hypertermické aktivaci genu omezena, může být využívána během jiných buněčných odpovědí. Je například známo, že HSF1 je aktivován jinými proteotoxickými činidly, včetně arsenitu, kadmia, inhibitorů proteazomu a analogů aminokyselin, z nichž většina také indukuje expresi *HMOX1*. Kromě toho role distálního HSE

a jeho příbuzných vazebných proteinů nemusí být za stresových podmínek omezena na regulaci genů (Alam & Cook 2006).

U faktoru HSF1 byla odhalena role při regulaci nestresových genů, při postupu buněčných cyklů, v embryonálním vývoji, buněčné diferenciaci a spermatogenezi (Morange 2006). HSF1 je nezbytný zejména pro konstitutivní expresi HSP70 a udržování redoxní homeostázy za bazálních podmínek (Yan et al. 2002). Myši s deficitem HSF1 vykazují defekty chorioallantoisu, vedoucí ke zvýšené prenatalní letalitě. A kromě ztráty HSR a neschopnosti získat termotoleranci vykazují myši, které přežívají do dospělosti další patologie, včetně snížené plodnosti, zpomalení růstu a zvýšené citlivosti na endotoxiny. Mnoho z těchto abnormalit lze pozorovat u myši s deficitem HO-1 (Alam & Cook 2006).

3.2.2.2 Bach1

Bach1 (transkripční faktor BTB a CNC homologie 1) je transkripční faktor a člen rodiny Cap 'N' Collar (CNC-bZip) faktorů. N-terminální oblast proteinu Bach1 obsahuje doménu (BTB), která interaguje s jinými proteiny a C-terminální bZIP oblast se váže na DNA a zprostředkovává heterodimerizaci Bach1 s Maf proteiny. Na rozdíl od ostatních členů této rodiny je Bach1 poměrně specifický (Davudian et al. 2016). Bylo prokázáno, že je Bach1 klíčovým regulátorem indukovatelné exprese genu *HMOX1* (Gozzelino et al. 2010).

Transkripční faktor Bach1 je široce exprimován ve většině savčích tkání a funguje primárně jako transkripční represor po heterodimerizaci s malými proteiny Maf a vazbou k rozpoznávacím elementům (MARE) v promotorech cílených genů. Jakmile je vytvořen heterodimer Bach1-Maf, inhibuje transkripci mnoha genů (např. *HMOX1*, *NQO1*) (viz Obr. 4) (Sun et al. 2002). Má klíčovou regulační úlohu při produkci reaktivních druhů kyslíku, buněčném cyklu, homeostáze hemu, hematopoéze a imunitě (Zhang et al. 2018).



Obrázek 4 Bach1 jako transkripční represor (Sun et al. 2002)

Bach1 má v základě dvojí funkci. Hlavní je funkce transkripčního represoru a druhá je senzor pro množství buněčného hemu. V nestresových podmínkách formuje Bach1 heterodimer s Maf proteiny. Heterodimer Bach1-Maf se váže na responzivní elementy, které jsou přítomny v *HMOX1* promotoru a tím je zamezeno jeho transkripci (Zhang et al. 2018).

Bach1 obsahuje oblasti vázající hem, skrz které zvýšený obsah hemu v reakci na oxidativní stres může inhibovat Bach1 vaznou aktivitu na DNA a tím je podpořena transkripce genu *HMOX1*. Bach obsahuje šest CP motivů (cystein-prolin). Čtyři jsou umístěny v regionu vázajícím hem, blízko C-terminální oblasti. Hem inaktivuje Bach1 interakcí se dvěma CP motivy. Navázáním hemu na Bach1 C-terminální doménu způsobí disociaci Bach1 z Maf proteinu. Bach1 je přenesen do cytoplazmy pomocí lokalizačního signálu ležícího na Bach1 C-terminální doméně. Po exportu do cytoplazmy je Bach1 spojen s IHABP a tvoří vláknité struktury na mikrotubulech. IHABP určuje subcelulární lokalizaci Bach1. Dochází k jeho

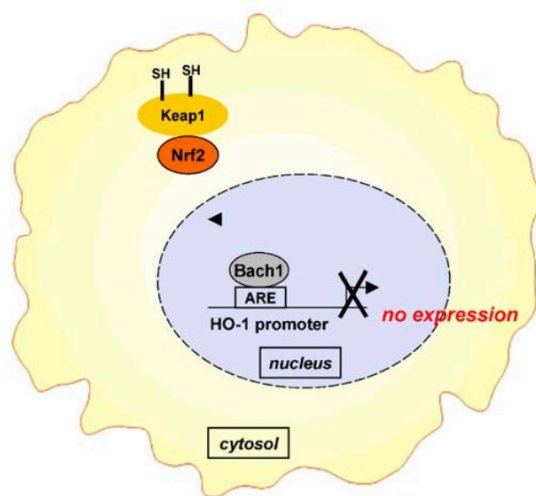
polyubiquitinaci pomocí HO1L-1 a následné degradaci cestou 26S proteasomu (Ogawa et al. 2001).

Pokud tedy dojde ke snížení nitrobuněčného hemu, Bach1 může tvořit heterodimer s Maf a vázat se na elementy *HMOX1*. Tím je potlačena jeho transkripce. Naopak zvýšený intracelulární hem nebo sulfohydroxylová oxidace inaktivují Bach1, což umožňuje transkripční indukci *HMOX1* pomocí Nrf2 transkripčního faktoru (viz Obr. 5) (Zenke-Kawasaki et al. 2007).

Bach1 nereguluje pouze expresi genu *HMOX1* hemem, ale také jinými prooxidačními sloučeninami, jako je kadmium, diamid a arsenit sodný (Paine et al. 2010).

Navíc jiné metaloporfíny, jako kobalt protoporfyrin, mohou způsobit polyubiquitinaci a následně degradaci transkripčního faktoru Bach1. Ve stejnou dobu tato sloučenina může stabilizovat vazbu transkripčního faktoru Nrf2 na Maf protein, za účelem zvýšení genové exprese (Nquyen et al. 2004).

O souhře mezi Bach1 a Nrf2 a regulaci exprese genu *HMOX1* se stále debatuje. Bylo prokázáno, že arsenitan sodný způsobuje indukci *HMOX1* specifickou pro Bach1, ale nezávislou na Nrf2, zatímco regulace závislá na arsenitanu sodném prostřednictvím tohoto mechanismu nebyla pozorována u jiných genů, jako je například thioredoxin reduktáza-1 (Reichard et al. 2008). Podobně bylo prokázáno, že knockdown Bach1 v lidských keratinocytech specificky zvyšuje regulovanou genovou expresi *HMOX1*, ale nikoli expresi jiných genů závislých na Nrf2 (MacLeod et al. 2009). Transkripční faktor Nrf2 je popsán v následující části textu.



Obrázek 5 Funkce Bach1 závislá na transkripčním faktoru Nrf2 (Paine et al. 2010)

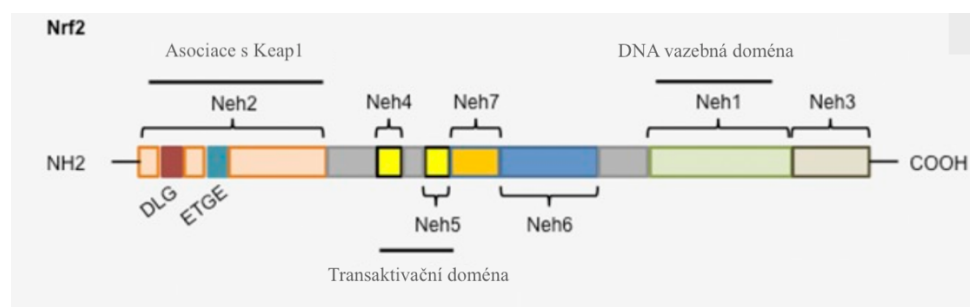
3.2.2.3 Keap1/Nrf2

Nrf2 (nuclear factor erythroid- 2- related factor 2) je dobře známý transkripční faktor, který hraje důležitou roli v regulaci buněčných antioxidantů a obraných odpovědí na stres. Patří do rodiny Cap 'N' Collar stejně jako Bach1. Nrf2 může chránit buňky a tkáně tím, že zvyšuje expresi několika cytoprotektivních genů, které jsou schopny bojovat proti škodlivým účinkům přicházejícím z vnějšího i vnitřního prostředí. Ukázalo se, že aktivace obranné odpovědi Nrf2

chrání před neurodegenerativními chorobami, cukrovkou, fotooxidačním stresem, kardiovaskulárními chorobami, záněty a plicní fibrózou (Jaramillo & Zhang 2013).

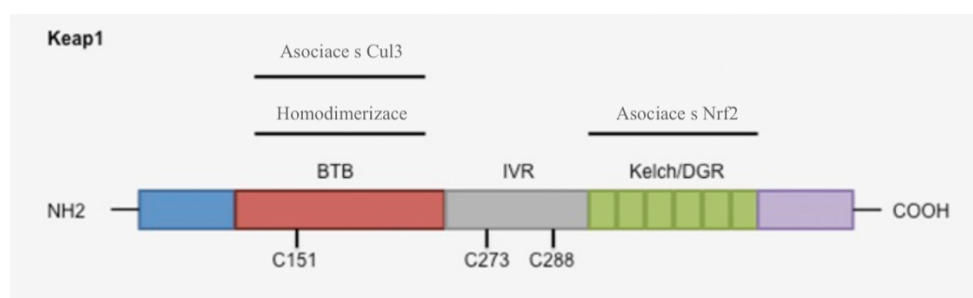
Různé studie však prokázaly, že Nrf2 podporuje přežitelnost nejen normálních buněk, ale také rakovinných buněk. Akumulace Nrf2 v rakovinných buňkách vytváří příznivé prostředí pro růst buněk a chrání je před oxidačním stresem, chemoterapeutiky a radioterapií (Lau et al. 2008).

Nrf2 obsahuje sedm funkčních domén, zobrazených na Obr. 6 a označovaných Neh1-Neh7. Neh2 je doména, lokalizovaná v N-terminální oblasti Nrf2 a je hlavní regulační doménou. Neh2 obsahuje sedm lysinových zbytků, které jsou zodpovědné za konjugaci ubikvitinu a dvě vazebná místa ETGE a DLG, které regulují stabilitu Nrf2 (McMahon et al. 2006). Motivy ETGE a DLG interagují s Keap1, což je substrátový protein pro Cullin3 (Cul3), který podporuje ubikvitinaci a následnou proteazomální degradaci Nrf2 (Zhang et al. 2004).



Obrázek 6 Domény transkripčního faktoru Nrf2 (Jaramillo & Zhang 2013)

Keap1 (kelch-like ECH associated protein 1) je známý jako Nrf2 inhibitor (Motohashi et al. 2002). Keap1 má tři funkční domény zobrazené na Obr. 7, BTB (broad/tramtrack/bric-a-brac komplex), IVT (intervenující region) a Kelch doménu DGR. BTB váže Cul3 a tato vazba je nutná pro dimerizaci Keap1. DGR doména je důležitá pro udržení interakce mezi Nrf2 a Keap1 tím, že interaguje s Neh2. IVR spojuje BTB a DGR domény a obsahuje několik cysteinových zbytků, které regulují aktivitu Keap1 (Jaramillo & Zhang 2013).

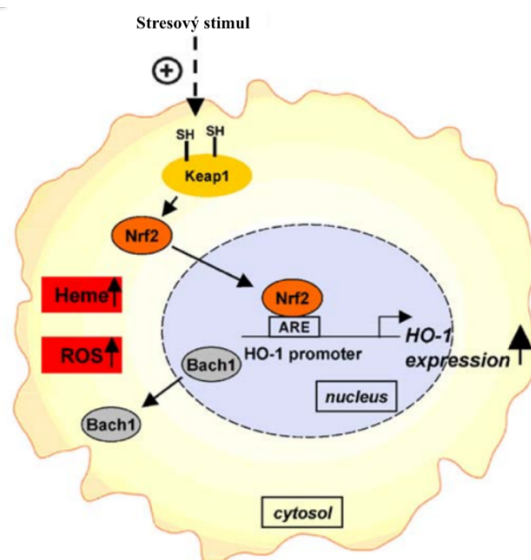


Obrázek 7 Domény inhibičního proteinu Keap1 (Jaramillo & Zhang 2013)

Za normálních podmínek Nrf2 tvoří komplex s Keap1. Keap1 a Cullin3 formují unikátní ubiquitin E3 ligázu, která aktivně podporuje ubiquitin dependentní proteosomální degradaci Nrf2 (Stewart et al. 2003). V odpovědi na oxidativní stres je Keap1 terčem ubiquitinace a degradace, což dovoluje Nrf2 disociovat z Keap1 a translokovat do jádra, kde aktivuje ARE a tím zrychluje transkripci cílového genu (Kaspar et al, 2009).

Jakmile je Nrf2 v jádře, soutěží s Bach1 o vazbu s malými Maf proteiny k formování heterodimerického komplexu se StRE/ARE (viz Obr. 8). Ve stresových podmínkách je Bach1

uvolněn ze StRE v *HMOX1* promotoru a tím dává přístup Nrf2 k StRE a tím indukuje transkripci genu *HMOX1* (Sun et al. 2002).



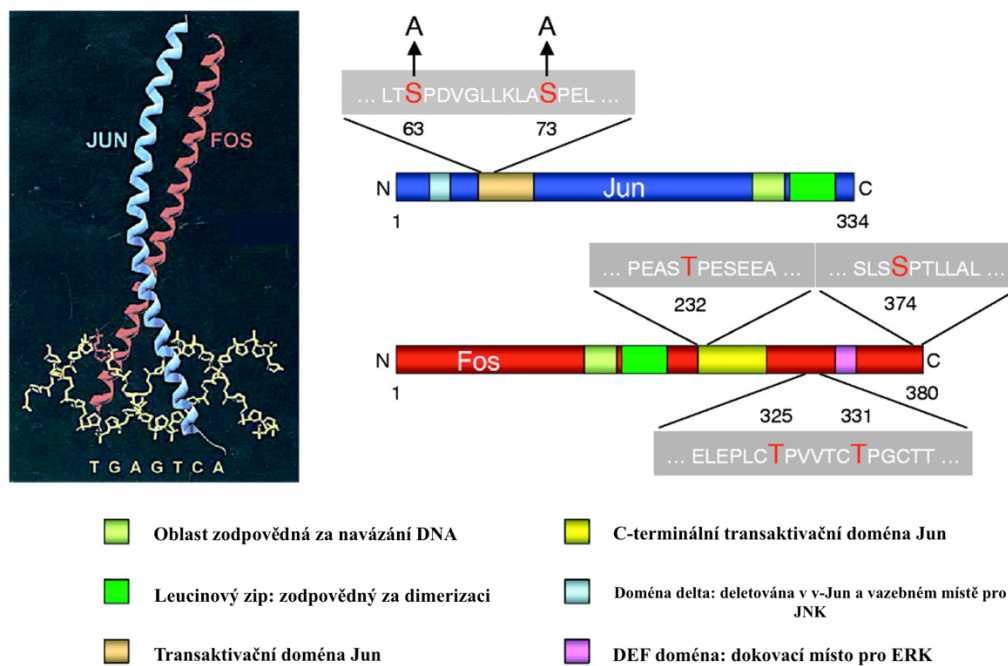
Obrázek 8 Funkce Nrf2 a jeho závislost na jiných faktorech (Paine et al. 2010)

3.2.2.4 AP-1

AP-1 řídí jak bazální, tak indukovatelnou transkripci několika genů, obsahujících místa pro AP-1, také známé jako TPA responzivní elementy (TRE) (Hess et al. 2004).

AP-1 souhrnně popisuje skupinu strukturně a funkčně příbuzných členů proteinové rodiny Jun (c-Jun, JunB, JunD) a proteinové rodiny Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) (viz Obr. 9). Navíc se na sekvence podobné TRE mohou vázat někteří členové podrodiny ATF (ATFa, ATF-2, ATF-3) a JPD (JPD-1, JPD-2), kteří sdílejí strukturální podobnost s ostatními členy. Každý z těchto proteinů je exprimován a regulován odlišně, což znamená, že každý typ buněk má komplexní směs dimerů AP-1 s trochu odlišnými funkcemi (Paine et al. 2010).

Společným znakem všech těchto proteinů je evolučně konzervovaná bZIP doména. Leucinový zip je zodpovědný za dimerizaci, která je předpokladem pro vazbu DNA. Složení leucinového zipu je také zodpovědné za specifitu a stabilitu homo- a heterodimerů tvořených různými proteiny Jun a Fos. Zatímco Jun proteiny existují jako homo- i heterodimery, Fos proteiny nemohou homodimerizovat a tvoří stabilní heterodimery s Jun proteiny. Na rozdíl od dobře charakterizované domény bZIP jsou strukturální vlastnosti domén zprostředkujících transkripční aktivaci méně známé. c-Jun, c-Fos a FosB jsou považovány za silné transaktivátory. JunB, JunD, Fra-1 a Fra-2 vykazují pouze slabý transaktivací potenciál, který za specifických okolností může působit jako represor AP-1 aktivity, nebo mohou tvořit nefunkční heterodimery s c-Jun, Fos nebo FosB (Hess et al. 2004).



Obrázek 9 Struktura AP-1 a složení domén Jun a Fos (Hess et al. 2004)

AP-1 je zapojen v kontrole několika buněčných procesů zahrnujících proliferaci, diferenciaci, apoptózu a adaptivní reakce na stres. Aktivita AP-1 je v dané buňce regulována širokou škálou fyziologických a patologických stimulů, jako jsou růstové faktory, cytokiny, stresové faktory, neurotransmitery, polypeptidové hormony, interakce mezi buňkou a matrixem, bakteriální nebo virové infekce a několik fyzických i chemických stresů (Shaulian & Karin 2002).

Je možné regulovat aktivitu AP-1. Například změnami v transkripci genů kódujících podjednotky AP-1, kontrolou stability jejich mRNA, posttranslačním zpracováním a specifickými interakcemi mezi proteiny AP-1 a dalšími transkripčními faktory a kofaktory (Hess et al. 2004).

Generováním geneticky modifikovaných buněk, ve kterých došlo ke změně nebo odstranění některých členů AP-1, objasnilo jejich individuální fyziologické funkce při buněčné proliferaci a diferenciaci, apoptóze a neoplastické transformaci (Eferl & Wagner 2003).

Ukázalo se, že indukovatelná genová exprese prostřednictvím AP-1 je zapojena do různého rozsahu buněčných odpovědí, včetně imunologických a antioxidantních stresových odpovědí (Hess et al. 2004).

Objasnění molekulárních mechanismů, které jsou zapojeny do regulace genu *HMOX1* závislé na AP-1, je z různých důvodů náročné. Za prvé, klasické místo AP-1 (TGATGCA) je obsaženo v konsenzuální sekvenci ARE (TGCTGAGTCA), která je lokalizována v oblastech E1 a E2 promotoru genu *HMOX1* a slouží jako hlavní cílová místa pro Nrf2. Křížení Nrf2 s členy rodiny AP-1 se zdá být velmi složité. Například bylo zjištěno, že c-Jun přímo interaguje s Nrf2 pro aktivaci exprese genů regulovaných ARE chemickou sloučeninou 4-hydroxy-2-nonenal (Levy et al. 2009). Navíc bylo prokázáno, že Nrf2 by mohl nepřímo regulovat indukovatelnou expresi genu pro katalytickou podjednotku glutamát cystein ligázy aktivací AP-1 (Yang et al. 2005).

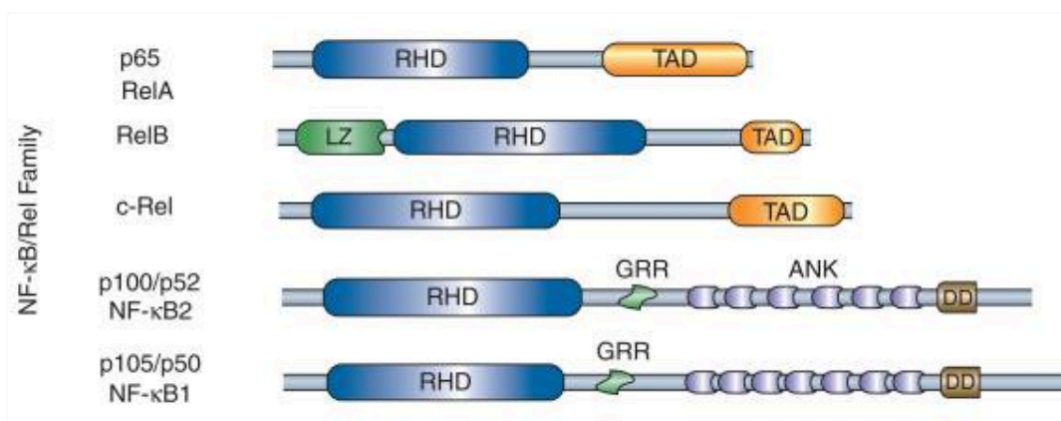
V *HMOX1* promotoru bylo identifikováno několik vazných míst pro AP-1. Nrf2 a CREB/ATF (cAMP response element-binding protein) rodiny transkripčních faktorů mohou také vázat tyto části. Tím je role AP-1 proteinů v aktivaci *HMOX1* omezena. Nicméně je prokázáno, že AP-1 proteiny regulují expresi *HMOX1* liposacharidy, zánětlivými cytokiny, hemem a arsenitem (Reichard et al. 2008).

3.2.2.5 NF-κB/Rel

NF-κB je exprimován téměř ve všech typech buněk a tkání. V promotorech velkého počtu genů se nachází vazebná místa pro NF-κB. NF-κB hraje roli při zprostředkování reakcí v odpovědi na rozmanité vnější podněty a je tedy klíčovým prvkem ve fyziologických a patologických procesech. Geny, jejichž exprese je regulovaná NF-κB, hrají důležité role v procesech jako je apoptóza, proliferace, diferenciace a odpovědi na buněčný stres. Seznam genů kontrolovaných NF-κB je rozsáhlý (Oeckinghaus & Ghosh 2009).

Díky své schopnosti ovlivňovat expresi genů je aktivita NF-κB přísně regulována na více úrovních. Primárním mechanismem je regulace prostřednictvím inhibičních IκB proteinů a kinázy (IκK), která fosforyluje IκB. Mnoho posttranslačních modifikací také mění aktivitu IκB, IκK a samotné molekuly NF-κB (Oeckinghaus & Ghosh 2009).

Rodina transkripčních faktorů NF-κB u savců se skládá z pěti proteinů p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF-κB1) a p100/52 (NF-κB2), které se navzájem spojují a vytvářejí odlišně transkripčně aktivní homo- a heterodimerní komplexy. Tyto proteiny sdílí konzervovanou 300 aminokyselin dlouhou Rel homologickou doménu (RHD) zobrazenou na Obr. 10 (Ghosh et al. 1998). Sekvence RHD jsou nutné pro dimerizaci, vazbu k DNA, interakci s IκB a jadernou translokaci.



Obrázek 10 Zástupci rodiny proteinů NF-κB s homologickou doménou RHD, TAD-transactivation domain, LZ-leucine zipper, GRR-glycine rich region, ANK-ankyrin repeats, DD – death domain (Oeckinghaus & Ghosh 2009).

Ve většině nestimulovaných buněk jsou dimery NF-κB udržovány v neaktivní formě v cytosolu prostřednictvím jejich interakce s proteiny IκB. Degradace těchto inhibitorů po jejich fosforylaci komplexem IκB kinázy (IκK), vede k nukleární translokaci NF-κB a indukci transkripce cílových genů (Liang et al. 2004).

Členové rodiny Rel mohou tvořit až 15 různých dimerů. Dosud však nebyla prokázána fyziologická existence a význam pro všechny možné dimerní komplexy. Heretodimer p50/65

představuje nejhojnější Rel dimer, který se nachází téměř ve všech typech buněk (Hayden a Ghosh, 2004).

Přítomnost dvou funkčních NF- κ B vazných sekvencí uvnitř *HMOX1* genu navrhuje, že NF κ B je část zodpovídající za aktivaci *HMOX1* hemem a možná zánětlivými cytokiny či jinými stimuly (Ghosh & Karin 2002).

Ve studii Naidu et al. (2008) byla identifikována funkční vazebná místa pro NF- κ B v promotorech potkaního a myšího *HMOX1* genu. Bylo prokázáno, že prvek κ B oblasti promotoru genu pro proximální potkaní gen *HMOX1* řídí regulaci *HMOX1* pomocí forbolesteru (PMA), který je aktivátorem makrofágů. PMA závislá regulace exprese *HMOX1* nebyla pozorována v buňkách myší, které byly deficitní pro NF- κ B podjednotku p65 a byly zprostředkovány cestou nezávislou na I κ B kináze.

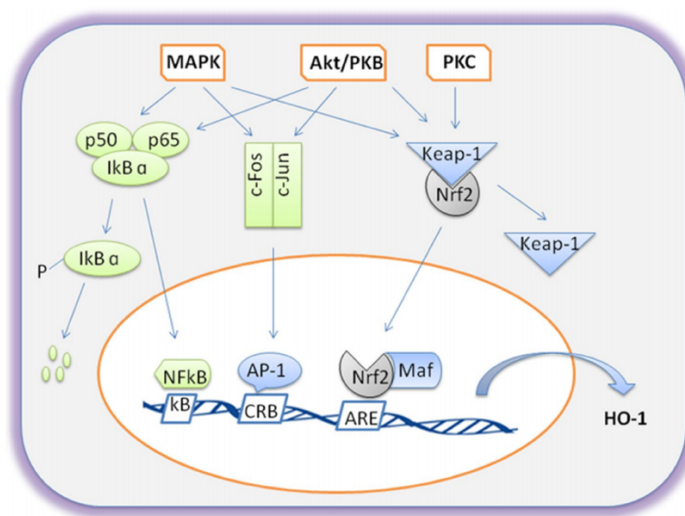
Souhrnně se zdá, že NF- κ B se přímo podílí na indukci exprese genu *HMOX1*.

3.2.3 Signální kaskády vedoucí k aktivaci genu *HMOX1*

Přestože se hem považuje za element zvyšující transkripci genu *HMOX1* přímým navázáním na Bach1, obecně většina induktorů *HMOX1* reguluje aktivitu transkripčních faktorů nepřímo aktivací signálních kaskád. Vzhledem k velkému množství induktorů HO-1 by nemělo být žádným překvapením, že do regulace je zapojeno mnoho proteinových kináz včetně proteinových kináz A a G, tyrosin kináz a enzymů PI3K / Akt a JAK / STAT. Nicméně různé studie ukazují, že signální kaskády kaskády MAPK jsou hlavní mediátory této reakce (Paine et al. 2010).

S expresí *HMOX1* jsou spojeny různé intracelulární signalizační molekuly a transkripční faktory, jako jsou Nrf2, Bach1, AP-1, NF- κ B a další (viz Obr. 11) (Farombi & Surh 2006).

Exprese *HMOX1* je primárně regulována na úrovni transkripce a různé regulační prvky (REs) jsou spojeny, aby zprostředkovaly základní a indukovatelné úrovně exprese genu *HMOX1*. Dvě upstream enhancerové oblasti (E1 a E2) hrají hlavní funkční role v indukci *HMOX1* (Alam & Cook 2006).



Obrázek 11 Různé indukční cesty *HMOX1* (HO-1) (Waza et al. 2018)

3.2.3.1 MAPK signální cesta

Mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK) jsou serin/threonin proteinové kinázy, které hrají hlavní roli při přenosu signálu z buněčného povrchu do jádra. Všechny eukaryotické buňky mají více MAPK cest, které regulují genovou expresi, metabolismus, přežití, apoptózu a diferenciaci (Cargnello & Roux 2011).

MAPK se skládají z extracelulárních kináz ERK (ERK1/ 2), regulovaných růstovým faktorem, c-Jun NH₂-terminálních kináz (JNK1/ 2/ 3) a p38 MAPK (α , β , γ , δ), které jsou aktivované stresovými faktory. Každá skupina se skládá ze sady tří postupně působících kináz: MAPK, MAPK kináza (MAPKK) a MAPKK kináza (MAPKKK). MAPKKK jsou často aktivovány fosforylací či interakcí s proteiny Ras/Rho v reakci na extracelulární stimuly. Aktivace MAPKKK vede k fosforylaci a aktivaci MAPKK, která pak stimuluje aktivitu MAPK duální fosforylací na zbytcích Thr a Tyr (Son et al. 2010).

Aktivace MAPK závisí na specifických kinázách MAPKK, které jsou fosforylovány MAPKKK. Kromě toho mohou být MAPK regulovány fosfatázami MAPK. Celková odpověď na signál je v komplexní rovnováze mezi fosforylací a defosforylací kinázami (Cargnello & Roux 2011).

ERK1 a ERK2 sdílejí 83 % aminokyselinovou identitu a jsou exprimovány v různých mezích ve všech tkáních, se zvláště vysokou hladinou v mozku, svalech, brzlíku a srdci. Jsou aktivovány růstovými faktory (PDGF, EGF, NGF) a ligandy pro receptory spojené s G proteinem (GPCR), cytokiny a osmotickým stresem (Raman et al. 2007). Modul ERK1/ 2 se skládá z MAPKKK A-Raf, B-Raf a Raf-1, MAPKK MEK1 a MEK2 a MAPK ERK1 a ERK2 (viz Obr. 12). Modul hraje ústřední roli v řízení proliferace buněk. Aktivita ERK1/ 2 je stimulována mitogenními činidly a v normálních buňkách je pro účinnou progresi G₁ až S fáze vyžadována trvalá aktivace těchto kináz. ERK1/ 2 kontroluje proliferaci buněk prostřednictvím několika mechanismů. ERK1/ 2 fosforyluje a aktivuje transkripční faktor Elk-1, který se podílí na expresi genů, jako je gen pro c-Fos. ERK1/ 2 stabilizuje c-Fos protein přímou fosforylací, čímž umožňuje c-Fos sdružovat se s c-Jun a vytvářet transkripčně aktivní komplexy AP-1. AP-1 aktivita je vyžadována pro expresi cyklin D1 proteinu, který interaguje s cyklin dependentními kinázami (CDK) a umožňuje přechod G₁/ S a postup buněčného cyklu (Shaulian & Karin 2002).

p38 α je 50% identický s ERK2. p38 α a p38 β jsou všudypřítomně exprimovány v buněčných liniích a tkáních a p38 γ a p38 δ mají omezenější expresi a mohou mít více specializované funkce. Izoformy p38 jsou aktivovány různými stresovými stimuly, jako např. UV záření, hypoxie, ischemie, bakteriální lipopolysacharidy a další. Předpokládá se, že MEK3 a MEK6 jsou hlavní proteinové kinázy zodpovědné za aktivaci p38, ale ukázalo se, že MEK4 má určitou aktivitu vůči p38. Zatímco MEK6 aktivuje všechny izoformy p38, MEK3 je o něco selektivnější, protože přednostně fosforyluje izoformy α , γ , δ . Aktivace izoform p38 je výsledkem fosforylace katalyzované MEK3/ 6 konzervovaného motivu Thr-Gly-Tyr v jejich aktivačních smyčkách (Kim et al. 2008).

Izoformy p38 jsou přítomny v jádrech a cytoplazmě buněk a bylo prokázáno, že se hromadí v jádrech buněk vystavených určitému stresu. Po stimulaci fosforylují izoformy p38 velké množství substrátů v mnoha buněčných kompartmentech (Cuadrado & Nebreda 2010).

Modul p38 hraje rozhodující roli v imunitních a zánětlivých reakcích. Hlavní funkcí izoform p38 je produkce prozánětlivých cytokinů a p38 může regulovat expresi cytokinů modulací transkripčních faktorů, jako je NF- κ B, nebo na úrovni mRNA, modulací jejich stability a translace prostřednictvím regulace MNK1 a MK2/3. Zdá se, že p38 α je hlavní izoformou účastnící se zánětlivé odpovědi (Kim et al. 2008).

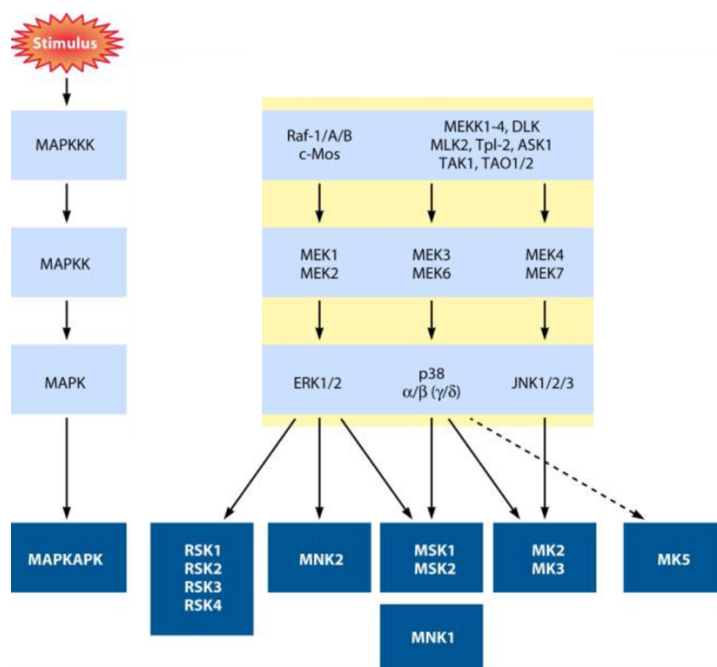
Izoformy p38 také hrají roli v buněčné proliferaci a přežití. p38 α negativně reguluje progresi buněčného cyklu jak u přechodů G1/ S, tak G2/ M řadou mechanismů, včetně downregulace cyklínů a upregulace inhibitorů CDK. Účinky p38 α jsou také spojeny s indukcí apoptózy buněčným stresem. Tyto účinky mohou být zprostředkovány transkripčními a posttranskripčními mechanismy, které ovlivňují různé receptory a pro- nebo antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2 (Cuenda & Rousseau 2007).

Existují tři známé izoformy JNK (JNK1, JNK2, JNK3), které jsou si více než 85% podobné a jsou kódovány třemi odlišnými geny. JNK1 a JNK2 mají širokou distribuci v tkáních, zatímco se zdá, že JNK3 je primárně lokalizován v neuronální tkáni, varlatech a srdečních myocytech (Bode & Dong 2007). Podobně jako p38 MAPK jsou izoformy JNK aktivovány v reakci na různé buněčné stresy jako tepelný šok, ionizující záření, oxidační stres, cytokiny, UV záření, inhibitory syntézy DNA a proteinů a v menší míře růstovými faktory a některými ligandy GPCR (Bogoyevitch et al. 2010).

Aktivace JNK izoform vyžaduje fosforylaci na Thr a Tyr zbytcích v Thr-Pro-Tyr konzervovaném motivu. MAPKK, které katalyzují tuto reakci jsou známé jako MEK4 a MEK7 a spolupracují při fosforylaci a aktivaci JNK. MEK4/7 jsou fosforylovány a aktivovány několika MAPKKK, včetně MEKK1-4, MLK1-3, Tpl-2, DLK, TA01/2, TAK1 a ASK1/2 (Wagner & Nebreda 2009).

Stejně jako u ERK1/2 a p38 MAPK bylo prokázáno, že po aktivaci se část JNK přemístí z cytoplazmy do jádra. Transkripční faktor c-Jun je substrátem JNK a existují funkční rozdíly mezi izoformami JNK, pokud jde o c-Jun regulaci. Další transkripční faktory, které jsou fosforylovány pomocí JNK jsou p53, ATF-2, c-Myc, JunB, STAT3, HSF-1, NF-ATc1 a Elk-1 (Raman et al. 2007).

JNK1 a JNK2 hrají důležitou roli při kontrole buněčné proliferace. Prostřednictvím c-Jun, aktivita JNK podporuje tvorbu komplexu AP-1 a transkripci genů obsahujících vazebná místa pro AP-1, včetně genů, které řídí buněčný cyklus, jako je cyklín D1 (Sabapathy et al. 2004). Izoformy JNK také mají důležitou roli v apoptotické odezvě na buněčný stres (Dhanasekaran & Reddy 2008).



Obrázek 12 MAPK signální kaskády vedoucí k aktivaci MAPKAPK. Tečkované čáry naznačují, že ačkoli jsou hlášeny regulace substrátu příslušnou kinázou, musí být důkladně prokázána (Cargnello & Roux 2011)

Značné množství dat podporuje roli MAPK kaskád při aktivaci genu *HMOX1* (Alam & Cook 2005). Z těchto údajů lze odvodit několik obecných závěrů.

1) Mnoho strukturně a funkčně rozdílných induktorů *HMOX1* aktivuje jednu nebo více ze tří hlavních MAPK kaskád ve více typech buněk. Některé induktory, jako je arzenit a kadmium, aktivují všechny tři cesty (Alam et al. 2000), zatímco jiné mohou vykazovat omezenější odpověď. Arsen ve formě arzenitanu sodného, stejně jako jiné těžké kovy, je také silným induktorem hem oxidázy. Je známo, že arzenit reaguje s thiolovou skupinou různých proteinů a je jedním z induktorů kaskád ERK, JNK a p38 (Kietzmann et al. 2003). JNK MAPK jsou aktivovány méně často než ERK a p38 kinázy.

2) Aktivace konkrétního MAPK nevede automaticky k indukci *HMOX1* (Ning et al. 2002).

3) Za určitých okolností může být pro optimální odpověď vyžadováno více MAPK cest (Zhang et al. 2002).

4) Pro daný induktor mohou být použité MAPK závislé na typu buňky. Například cesta ERK podporuje indukci *HMOX1* kadmíem v buňkách lidské rakoviny žaludku, ale nikoli v buňkách rakoviny prsu. Kromě toho se ERK a p38 MAPK podílejí na aktivaci *HMOX1* arsenitem v buňkách odvozených z kuřecích jater, ale enzymy JNK a p38 jsou vyžadovány pro stejnou odpověď v hepatocytech potkanů (Kietzmann et al. 2003).

5) Ze tří hlavních podrodin se k indukci *HMOX1* nejčastěji využívá kaskáda p38. Proteiny NFκB, Nrf2 a AP-1 jsou v těchto odpovědích nejčastěji implikovanými transkripčními faktory (Alam & Cook, 2006).

3.2.3.2 PI3K/Akt signální cesta

PI3K/ Akt je intracelulární signální cesta, která podporuje metabolismus, proliferaci, přežití buněk, růst a angiogenezi v reakci na extracelulární signály. Klíčovými molekulami zapojenými do této signální dráhy jsou RTK (receptorová tyrosinkináza), PI3K (fosfatidylinositol 3- kináza), PIP2 (fosfatidylinositol- 4, 5- bisfosfát), PIP3 (fosfatidylinositol- 3, 4, 5- trifosfát) a Akt (protein kináza B) (Ghigo et al. 2010).

RTK jsou buněčné povrchové receptory, které jsou vysoce afinitní pro mnoho polypeptidových růstových faktorů, cytokinů a hormonů. Tento receptor má tři funkční domény. Extracelulární doménu vázající ligand, transmembránovou doménu a intracelulární doménu tyrosinkinázy. Když se ligandy, jako je růstový faktor, vážou na RTK, dva monomery RTK se přiblíží a tvoří dimer, což vede k aktivaci intracelulární domény tyrosinkinázy (Hemmings & Restuccia 2012).

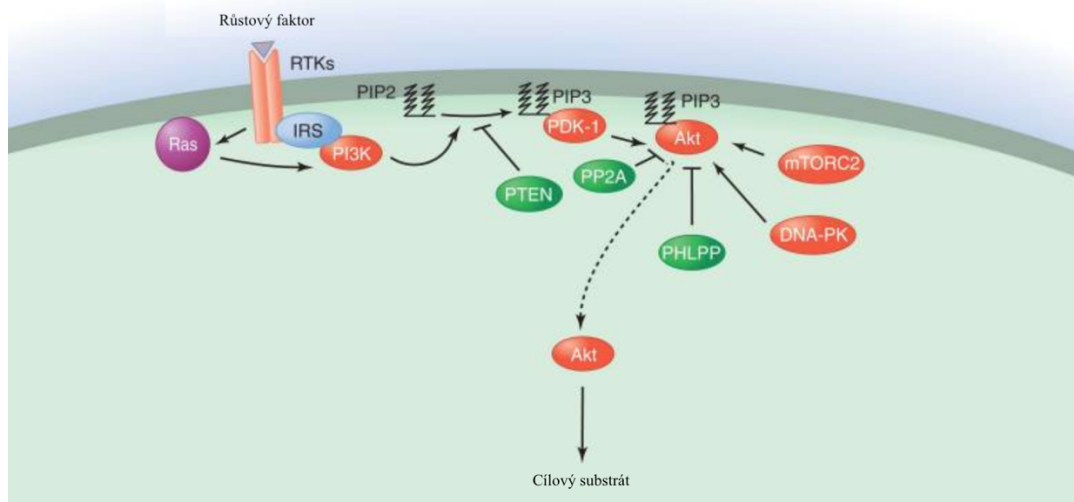
PI3K je kináza, která je schopna fosforylovat hydroxylovou skupinu v poloze 3 inositolového kruhu fosfatidylinositolu. PI3K se skládá ze dvou domén. Katalytické domény P110 a regulační domény P85. K aktivaci PI3K obvykle dochází v důsledku přímé stimulace prostřednictvím stimulační podjednotky navázané na aktivovaný receptor nebo nepřímé aktivace prostřednictvím molekul adaptéru, jako jsou proteiny IRS (insulin receptor substrate). PI3K může být také aktivován RAS proteinem vázajícím GTP (Hemmings & Restuccia 2012).

PIP2 a PIP3 jsou minoritními fosfolipidovými složkami buněčných membrán. PIP3 slouží obvykle jako tzv. dokovací fosfolipidy, které vážou specifické domény s následnou aktivací signálních kaskád. V signální dráze PI3K/Akt se může fosfátová skupina PIP3 vázat na Akt což vede k jeho částečné aktivaci. Fosforylace Akt na S473 v karboxy-terminálním hydrofobním motivu, buď mTORC2 nebo DNA-PK, stimuluje plnou aktivitu Akt (Hers et al. 2011).

Akt také pojmenovaný jako protein kináza B, je kináza specifická pro serin a threonin, která hraje klíčovou roli ve více buněčných procesech. Po aktivaci Akt reguluje funkci proteinů zapojených do buněčného růstu, proliferace, adheze, neovaskularizace a buněčné smrti (Brazil & Hemmings 2001).

Cesta PI3K/Akt musí být pečlivě regulována. Negativní regulace této dráhy je dosažena změnou PIP3 a inaktivací proteinu Akt. Fosfatáza PTEN je hlavní down regulační protein, který může převádět PIP3 na PIP2. Další dva negativní regulační proteiny jsou proteinová fosfatáza PP2A, která defosforyluje Akt na Thr308 a fosfatáza PHLPP, která defosforyluje Akt na pozici Ser473. Kromě těchto regulačních proteinů má samotná dráha také mechanismy zpětné vazby (viz Obr. 13). Transkripční faktor NF- κ B, aktivovaný pomocí Akt, reguluje PPAR δ a TNF α , které tlumí expresi PTEN. To tvoří pozitivní zpětnou vazbu. (Hers et al. 2011).

Negativní zpětná vazba je aktivována aktivací mTORC1 a S6K1. S6K1 je schopen fosforylovat IRS1 na více serinových zbytcích. To vede k zabránění vazby na RTK a potlačení aktivace PI3K (Manning & Cantley 2007).



Obrázek 13 Mechanismus pozitivní a negativní zpětné vazby signální dráhy PI3K/Akt (Hemmings a Restuccia, 2012)

Hromadný experimentální důkaz naznačil, že aktivace PI3K /Akt reguluje expresi genu *HMOX1*. Ukázalo se, že exprese genu *HMOX1* je v imunologických buňkách regulovaná prostřednictvím PI3K/ Akt v reakci na různé signály, jako jsou prostaglandiny nebo farmakologické sloučeniny (Martin et al. 2004).

PI3K /Akt a GSK3 (glycogen synthase kinase 3) mohou mít protiregulační funkce u genu *HMOX1*. Zdá se, že složitá souhra mezi těmito dvěma kinázami zahrnuje mechanismy, které řídí jadernou lokalizaci Nrf2 a Bach1 (Kaspar & Jaiswal 2010). Podrobnosti o základních regulačních mechanismech jsou však z velké části neznámé.

3.2.3.3 JAK/ STAT signální cesta

Cesta JAK/ STAT je hlavním signálním mechanismem pro širokou škálu cytokinů a růstových faktorů. Téměř 40 cytokinových receptorů signalizuje pomocí kombinace čtyř JAK proteinů a sedmi proteinů rodiny STAT. Aktivace JAK/ STAT stimuluje buněčnou proliferaci, diferenciaci, buněčnou migraci a apoptózu (Rawlings et al. 2004).

Intracelulární aktivace nastane, když vazba ligandu vyvolá multimerizaci receptorových podjednotek. U některých ligandů (erythropoetin, růstový hormon) jsou receptorové podjednotky vázány jako homodimery, zatímco u jiných (interferony, interleukiny) jsou receptorovými podjednotkami heteromultimery. Pro šíření signálu prostřednictvím homodimeru nebo heteromultimeru musí být cytoplazmatické domény spojeny s JAK tyrosinkinázami (Rawlings et al. 2004).

JAK jsou charakteristické tím, že mají na C-konci regulační doménu a doménu s aktivitou tyrosinkinázy. K aktivaci JAK dochází po multimerizaci receptoru zprostředkované ligandem. Aktivované JAK následně fosforylují svůj hlavní substrát STAT. STAT jsou transkripční faktory, které zůstávají v cytoplazmě, dokud nejsou aktivovány. STAT mají poblíž C-konce tyrosinový zbytek, který je fosforylován pomocí JAK. Tento fosfotyrosin umožňuje dimerizaci STAT pomocí jejich konzervované domény SH2. Fosforylované STAT vstupují do jadra a vážou se na specifické regulační sekvence pro aktivaci nebo potlačení transkripce

cílových genů (viz Obr. 14). Kaskáda JAK/ STAT tak poskytuje přímý mechanismus k převedení extracelulárního signálu na transkripční odpověď (Kisseleva et al. 2002).

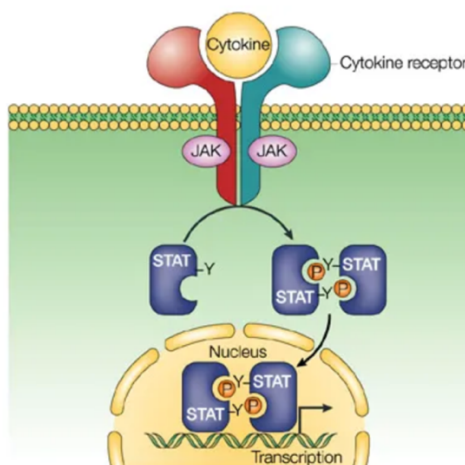
Kromě hlavních složek této dráhy byly identifikovány další efektorové proteiny, které podporují signální kaskádu JAK/ STAT. Patří sem proteiny STAM, StIP/WD40 a SH2B/ Lnk/ APS. Kromě efektorů dráhy JAK/ STAT existují tři hlavní třídy negativních regulátorů. SOCS, PIAS a PTP. Nejjednodušší jsou PTP, které reverzují aktivitu JAK. Z nich je nejlépe charakterizovaný protein SHP-1, který obsahuje dvě domény SH2 a může se vázat na fosforylované JAK a tím je defosforylovat (Seif et al. 2017).

Ačkoli je mechanismus signalizace JAK/ STAT teoreticky relativně jednoduchý, biologické důsledky aktivace dráhy jsou komplikovány interakcemi s jinými signálními dráhami. Nejlépe je charakterizována interakce s cestou Ras/ MAPK. Vztah mezi těmito kaskádami je složitý a jejich dráhy se kříží na více úrovních, z nichž každá zvyšuje aktivaci druhé (Rawlings et al. 2004).

Cytokinové receptory signalizují dva typy drah. Dráhu JAK/ STAT a další dráhy, které obvykle zahrnují aktivaci MAPK kaskády. Nyní existuje asi 36 kombinací cytokinových receptorů, které reagují na velký počet cytokinů. Různé buňky a tkáně exprimují odlišné kombinace receptorů, které reagují na kombinaci cytokinů jedinečné pro mikroprostředí nebo systémovou odpověď organismu. V kterémkoli daném okamžiku tedy může jedna buňka integrovat signály z více cytokinových receptorů. Genetické studie prokázaly, že systém cytokinových receptorů je omezující v tom, že různé třídy receptorů přednostně využívají jednu kombinaci JAK. Například receptory potřebné pro vývoj a proliferaci hemopoetických buněk používají JAK2, další receptory používají JAK1 a JAK3 (O'Shea et al. 2002).

Funkční prvky STAT byly identifikovány v promotorové oblasti lidského *HMOX1* genu (Weis et al., 2009). Bylo prokázáno, že protizánětlivý cytokin IL-10, který je hlavním inhibítorem aktivovaných makrofágů a dendritických buněk, indukuje expresi genu *HMOX1* (Lee & Chau 2002).

Ačkoli signalizační kaskády, které spojují expresi genu *HMOX1* s receptorem IL-10, nejsou jasné, aktivace JAK/ STAT byla opakovaně navrhována jako součást této regulační cesty (Ricchetti et al., 2004). Celkově je cesta IL-10 důležitým regulátorem exprese genu *HMOX1* v mononukleárních buňkách (Lee & Chau 2002).



Obrázek 14 JAK/ STAT signální kaskáda s cytokinovým ligandem (Shuai & Liu 2003)

3.3 Hem oxygenáza 1

Přestože je již mnoho let známo, že žlučové pigmenty jsou produkty fyziologické degradace hemu, je to teprve 50 let co byl poprvé identifikován a charakterizován enzym, který je zodpovědný za katabolismus hemu (Tenhunen et al. 1968).

Tento enzym byl označen jako hem oxygenáza 1 (HO-1) a v několika letech došlo k explozi nových informací o tomto enzymu. Aktivita HO-1 byla objevena v mikrozomech sleziny, jater, ledvin a kostní dřeni myši a nyní je všeobecně známo, že mikrozomální HO-1 hraje klíčovou roli ve fyziologickém katabolismu hemu u zvířat (Kikuchi et al. 2005).

HO-1 je cytoprotektivní enzym, který má protizánětlivé, antioxidační, antiapoptotické a antiproliferační účinky. HO-1 katalyzuje rozklad hemu za vzniku oxidu uhelnatého, železa a biliverdinu. Každý z těchto produktů má důležitou funkci v buněčné ochraně proti stresu a představuje přímé (oxid uhelnatý) nebo nepřímé (biliverdin prostřednictvím bilirubinu a železo indukci ferritinu) antioxidační a protizánětlivé účinky (Morse & Choi 2005).

3.3.1 Základní struktura

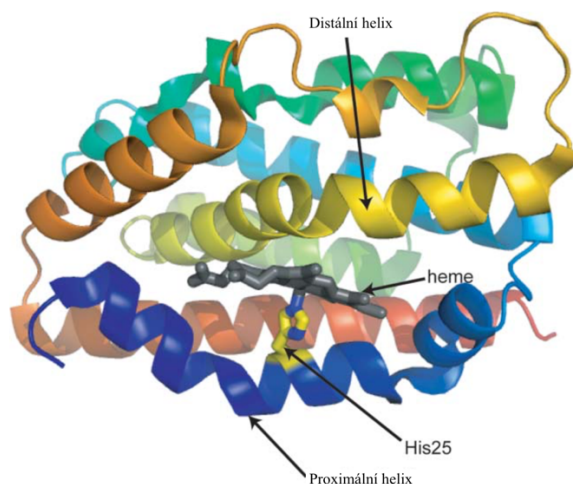
Dosud bylo stanoveno sedm struktur HO díky rentgenové krystalové analýze. Patří sem lidská (Schuller et al. 1999) a myši (Sugishima et al. 2000) HO-1 savčího původu, tři HO bakteriálního původu, HemO z *Neisseria meningitidis* (Schuller et al. 2001), HmuO z *Corinebacterium diphtheriae* (Hirotsu et al. 2004) a PigA z *Pseudomonas aeruginosa* (Friedman et al. 2004) a dvě HO izoformy cyanobakteriálního původu, Syn HO-1 (Sugishima et al. 2004) a Syn HO-2 (Sugishima et al. 2005).

Pro krystalizaci savčího HO-1 (~33 kDa) byly použity zkrácené a rozpustné verze (~28 kDa), které postrádají doménu vázající se na membránu. Na druhé straně bakteriální HO jsou o něco menší (~24-26 kDa) a jsou přirozeně rozpustné, protože tuto doménu nemají. Ačkoli homologie v aminokyselinové sekvenci mezi savci a bakteriálními HO je nízká, jejich krystalové struktury jsou velmi podobné (Kikuchi et al. 2005).

HO tvoří kompaktní doménu skládající se většinou z α -helixů (viz Obr. 15). Struktura HO byla nová ve srovnání s jakýmkoli jiným známým proteinem v proteinové datové bance. Struktury HmuO, HemO, PigA a Syn HO-1 a Syn HO-2 jsou velmi podobné strukturám lidského HO-1. Všechny výše uvedené proteiny jsou monomerní s výjimkou Syn HO-2, který tvoří homodimer (Sugishima et al. 2005).

Pro připojení skupiny hemu nejvíce přispívají proximální a distální helix. Protože se oba helixy liší od geometrie ideálního helixu, mohou být označovány jako „ohnuté“. Proximální šroubovice obsahuje His25 (v savčím HO-1), což je proximální hemový ligand. Hydroxylová skupina Thr21 se váže vodíkovými můstky s karbonylovým atomem kyslíku hlavního řetězce Leu17. Tato vodíková vazba a koordinační vazba mezi hemem, železem a dusíkem z His25, tvoří proximální šroubovici. Distální šroubovice je zauzlená díky vysoce konzervovanému motivu bohatému na Gly –YLGDLGGQ (ale sekvence není striktně konzervovaná v HemO a PigA). Na Gly bohatý motiv také umožňuje flexibilitu distální šroubovice. Například v lidském HO-1 je jedna ze dvou molekul v asymetrické jednotce volně, zatímco druhá je pevně zachycena. Tyto formy se označují jako otevřené a uzavřené (Schuller et al. 1999). Tato

flexibilita se zdá být důležitá pro otevření aktivního místa a k umožnění snadného vstupu substrátu a výstupu produktů.



Obrázek 15 Struktura hem oxygenázy (Unno et al. 2007)

V krystalových strukturách HO-1 a HmuO bez substrátu (tj. bez hemu) se proximální a distální helixy, které svírají skupinu hemu během tří po sobě jdoucích okysličovacích procesech, pohybují dále od sebe se změnami jejich konformací. To vede k otevření kapsy pro hem, tudíž k usnadnění jeho vazby. Porovnání struktur HemO bez hemu a s vázaným hemem ukazuje, že proximální helix je přímý v nepřítomnosti hemu a po vazbě na hem konkávní (Unno et al. 2007).

Elektrostatický potenciál na povrchu obklopujícím exponovaný okraj hem skupiny je u savců HO-1 pozitivní. Pozitivně nabitý molekulární povrch se zdá být výhodný pro vytvoření komplexu s elektronovým donorem CPR (cytochrom P450 reduktáza), který má převážně negativně nabitý povrch (Wang et al. 1997). Podobný rys je také nalezen v Syn HO-1, ale pozitivně nabitá oblast je užší než oblast savců HO-1 (Sugishima et al. 2004). To může odrážet velikost fyziologického redoxního partnera, protože redukovaný ferredoxin rostlinného typu, malý kyselý protein železa a síry, je možným dárcem elektronů pro Syn HOs (Cornejo et al. 1998).

HO-1 protein může být připraven za použití technologie bakteriální nadměrné exprese (Wilks & Ortiz deMontellano 1993). Byly stanoveny krystalové struktury lidských (Lad et al. 2003) a krysích (Sugishima et al. 2002) HO-1 a také těch HO, které jsou v komplexu s hem (Sugishima et al. 2000). Studie struktur HO vedly k významnému pokroku při vyjasňování mechanismů jednotlivých kroků reakce HO-1, ačkoliv je nutný další výzkum k vyřešení některých sporů týkajících se mechanismu některých kroků reakce (Kikuchi et al. 2005).

3.3.2 Izoformy

Systém hem oxygenáz se skládá ze tří izoenzymů: indukovatelné formy HO-1, konstitutivně exprimované formy HO-2, která má navíc N-koncový úsek prodloužen o 20 aminokyselin ve srovnání s HO-1, a nově identifikovaného hruhu HO-3 (Hayashi et al. 2004).

HO-1 je 32 kDa protein, který je ukotven k endoplazmatickému retikulu (ER) jediným hydrofobním transmembránovým segmentem (TMS) na C-konci. HO-1 kolokalizuje s CPR a

jejich interakce je nutná pro maximální enzymatickou aktivitu (Huber & Backes 2007). Je prokázáno, že HO-1 se lokalizuje do jiných organel, včetně kaveolů, mitochondrií a jadra, což zvyšuje možnost, že HO-1 může hrát jinou roli kromě degradace hemu (Kim et al. 2004).

HO-2 má molekulovou hmotnost 36 kDa a je exprimován všudypřítomně, se zvláště vysokými hladinami v mozku, varlatech a vaskulárních systémech. HO-2 se podílí na snímání kyslíku a regulaci vaskulárního tónu (Williams et al. 2004). CO působí jako vazodilatátor v periferních cévách, zatímco CO odvozené od HO-2 působí jako vazokonstriktor v mozkové cirkulaci tím, že brání cystathionin β -syntáze vytvářet vazodilatační sirovodík (Morikawa et al. 2012).

Aminokyselinová sekvence HO-2 sdílí 43% podobnost s HO-1 (Kikuchi et al. 2005). Oba proteiny mají společnou 24-aminokyselinovou sekvenci známou jako „kapsa vázající hem“ nebo „HMOX podpis“, která usnadňuje katabolismus hemu. Zatímco oba proteiny používají stejný substrát a kofaktor, liší se fyziologickými vlastnostmi a regulací (Dunn et al. 2014).

Hem oxygenáza 3 se považuje za pseudogen zpracovaný z transkriptu HO-2 (Reichard et al. 2008). HO-3 má velmi nízkou aktivitu: jeho fyziologická funkce pravděpodobně zahrnuje vázání hemu.

Enzymy HO-1 a HO-2 mají na svých C-terminálních oblastech hydrofobní sekvence, které se podílejí na vazbě na mikrozomální membránu. Je zajímavé, že trypsinem ošetřená HO postrádající C-terminální hydrofobní oblast je plně aktivní a je rozpustná ve vodě. Úspěšná tvorba těchto zkrácených HO-1 a HO-2 v *Escherichia coli* značně usnadnila charakterizaci HO a porozumění reakčního mechanismu pomocí HO na molekulární úrovni (Kikuchi et al. 2005).

3.3.3 Posttranslační strukturální modifikace HO-1

3.3.3.1 Fosforylace

Fosforylace proteinu je jednou z nejčastějších a důležitých posttranslačních modifikací. K tomuto reverzibilnímu mechanismu dochází prostřednictvím proteinových kináz a spočívá v přidání fosfátové skupiny (PO_4^{3-}) k polární skupině R různých aminokyselin. V důsledku toho se protein modifikuje z hydrofobního nepolárního na hydrofobní polární, což umožňuje proteinu změnit konformaci při interakci s jinými molekulami (Ardito et al. 2017).

Přidání fosfátové skupiny na vysoce konzervované, specifické tyrosinové, serinové nebo threoninové zbytky, je dobře známou posttranslační modifikací. HO-1 obsahuje silnou konsenzuální sekvenci pro fosforylaci serinu nebo threoninu proteinovou kinázou Akt. Fosforylace vede k mírnému zvýšení aktivity HO-1 ve srovnání s nefosforylovaným proteinem. Negativní náboj produkovaný fosforylací zvyšuje afinitu HO-1 k proteinům CPR a BVR. Jakékoli zvýšení aktivity Akt, by tedy mohlo vést ke zvýšení aktivity HO-1 (Dunn et al. 2014).

3.3.3.2 Palmitoylace

Kyselina palmitová je nasycená mastná kyselina s 16 uhlíky, která může být kovalentně navázána na řadu eukaryotických proteinů. Neexistuje žádný jasný konsenzuální sekvenční motiv pro palmitoylaci, přičemž k modifikaci dochází na kterémkoli jednom nebo více cysteinových zbytcích prostřednictvím thioesterové vazby. Thioesterová vazba se snadno štěpí,

což umožňuje palmitoylaci hrát významnou roli v buněčné signalizaci, subcelulárním transportu a interakcích mezi proteiny (Dowal et al. 2011).

Pokud jde o palmitoylaci HO-1, pouze myši a kuřecí proteiny obsahují cysteinový zbytek, což naznačuje, že HO-1 u těchto druhů by mohl být palmitoylovaný (Lynes et al. 2012).

Překvapivě, i přes nedostatek cysteinových zbytků, bylo hlášeno, že lidský HO-1 je palmitoylovaný v krevních destičkách, ačkoliv dosud zůstává účinek takové palmitoylace na funkci HO-1 neznámý (Dowal et al. 2011).

3.3.3.3 Acetylace

Acetylace je jednou z hlavních posttranslačních modifikací proteinů v buňce. Acetylová skupina z acetyl-koenzymu A může být navázána na α -amino skupinu N-konce proteinů nebo na ϵ -amino skupinu lysinových zbytků. Tyto reakce jsou katalyzovány různými N-terminálními a lysinovými acetyltransferázami. V případě acetylace lysinu je reakce enzymaticky reverzibilní. Souhra mezi acetylací a deacetylací je zásadní pro mnoho důležitých buněčných procesů (Drazic et al. 2016).

Při hodnocení lysinových zbytků, které jsou důležité pro interakci mezi potkaní HO-1 a CPR, bylo identifikováno devět (tj. K18, K22, K39, K48, K69, K149, K153, K179 a K196) z celkem patnácti lysinových zbytků hmotnostní spektrometrií. K149 a K153 byly chráněny před acetylací v přítomnosti CPR. Avšak v nepřítomnosti CPR byl krysí HO-1 acetylován na všech devíti lysinových zbytcích, což vedlo ke snížení aktivity proteinu. Tato data naznačují, že alespoň u potkanů může CPR modulovat aktivitu HO-1 prostřednictvím inhibice acetylace K149 a K153 (Higashimoto 2008).

HO-1 je také acetylován v K39 lidských rakovinových buněčných liniích (Choudhary et al. 2009) a v K18 v lidské jaterní tkáni (Zhao et al. 2010). Význam acetylace lidského HO-1 v těchto zbytcích zůstává nejasný. V případě K18 nebo K39 může acetylace udělit jadernou lokalizaci HO-1, což může být spojeno se změnami v genové transkripci (Collinson et al. 2011).

3.3.3.4 Ubikvitinace

Systém ubikvitinace je ve srovnání s jinými modifikacemi fosforylací složitější. Je to způsobeno schopností ubikvitinového řetězce tvořit polymery. Typ vazby ubikvitinového řetězce pak určuje, zda bude modifikovaný protein degradován proteazomem nebo bude dále využíván. Ubikvitinový komplex je velice komplexní a specifický (Komander 2009).

Degradace proteinů cestou ubikvitin-proteazomu umožňuje buňkám reagovat na měnící se prostředí. Ubikvitinace závislá na signálu často vede k úplné degradaci cílového proteinu. K obratu proteinu HO-1 dochází prostřednictvím systému ubikvitin-proteazomu v membráně spojené s ER. Tento systém degradace byl zjištěn u buněk hladkého svalstva cév (SMC), buněk HEK293T a buněk PC12 krysích adrenálních feochromocytomů (Dunn et al. 2014). V buňkách HEK293T je ER-rezidentní E3 ubikvitin ligáza zodpovědná za degradaci HO-1 prostřednictvím interakce s oblastí TMS (Lin et al. 2012).

Je zajímavé, že ošetření buněčné linie adenokarcinomu tlustého střeva, HCT116, inhibitorem proteazomu bortezomibem, vedlo k ubikvitinaci zbytků HM39, K39, K69, K86, K148, K153 a K243; zatímco ošetření inhibitorem proteazomu epoxomicinem vedlo k

ubikvitinaci K179 a K256 (Kim et al. 2011). Tato data naznačují, že ne všechny ubikvitinační události jsou regulovány identicky.

3.3.3.5 Dimerizace a zkracování

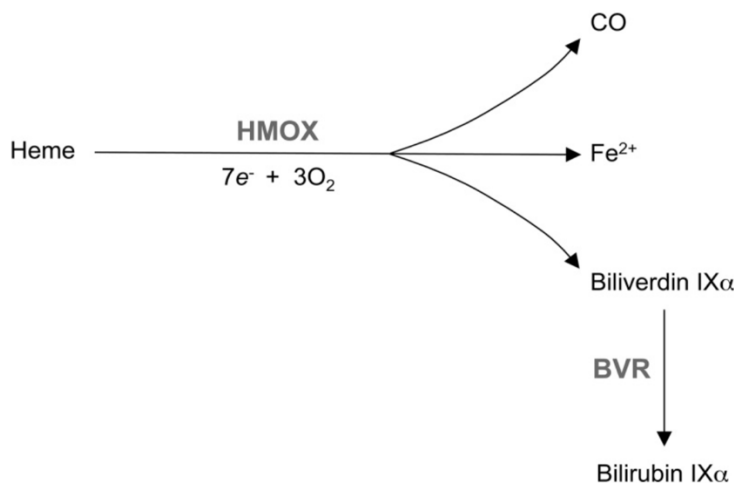
Nedostatek cysteinových zbytků v HO-1 vedl k předpokladu, že HO-1 působí jako monomer. Bylo prokázáno, že v ER buněk HEK293 se vytváří HO-1 dimery a oligomery, jejichž tvorba byla nezbytná pro jeho aktivitu (Hwang et al. 2009).

Mikrosomální HO-1 s plnou délkou (32 kDa) se snadno trypsinizuje, což vede ke zkrácenému proteinu rozpustnému ve vodě, který obvykle postrádá hydrofobní C-koncový TMS s 23 až 55 aminokyselinami (Yoshida & Kikuchi 1978). Bylo popsáno, že zkrácené formy HO-1 se lokalizují do jádra, přičemž cysteinové proteázy byly zapojeny do proteolytického štěpení.

Zatímco TMS HO-1 zvyšuje jeho interakci s CPR a BVR, existuje přesvědčivý důkaz, že HO-1 postrádající C-konec si zachovává katalytickou aktivitu (Dunn et al. 2014).

3.3.4 Enzymatická aktivita hem oxygenázy- 1

Hem oxygenáza-1 (HO-1), mikrosomální membránový protein, katalyzuje oxidační štěpení molekul hemu za vzniku ekvimolárních množství biliverdinu IX α , oxidu uhelnatého (CO) a železa (Fe $^{2+}$). Biliverdin je následně redukován na bilirubin cytosolovým enzymem, biliverdin reduktázou (BVR) (viz Obr. 16) (Alam & Cook 2006).



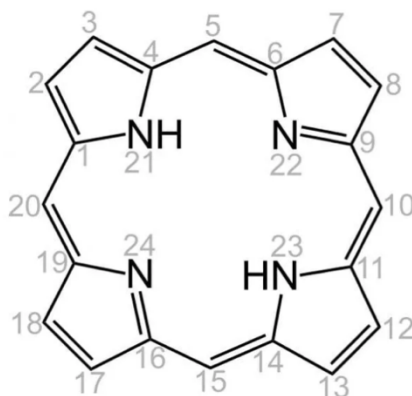
Obrázek 16 Rozklad hemu pomocí hem oxygenázy (Dunn et al. 2014)

3.3.4.1 Hem jako substrát pro funkci hem oxygenázy-1

Hem je organická molekula ve tvaru kruhu, který se skládá ze čtyř pyrrolů (tetrapyrrol) zobrazené na Obr. 17. Díky své speciální struktuře je hem schopen pojmout molekulu železa. Pokud má tetrapyrrol substituce na postranních řetězcích, které mu umožňují držet kovový ion, nazývá se metaloporfyrin (Gell 2018).

Molekula železa v hemu je udržována na místě vyváženými silami čtyř molekul dusíku. Tyto molekuly dusíku směřují dovnitř kruhu, který vytvářejí. Dvojně a jednoduché vazby, které

spojují pyrroly, jsou uspořádány rovnoměrně, takže elektrony zůstávají vyrovnané a celá molekula zůstává stabilní (Gell 2018).



Obrázek 17 Chemická struktura hemu (Gell 2018). Čísla označují body, ve kterých může molekula přijímat substituce a být modifikována pro konkrétní použití. Rozdíly v postranních řetězcích vázaných na uhlíky 3, 8 a 18 představují rozdíl mezi některými z nejběžnější skupin hemů. Například hemoglobin i myoglobin nesou hem b. Hem b nese kyslík a proteiny, které jsou připojeny, pomáhají uvolňovat kyslík ve vhodnou dobu. Hem a naproti tomu pracuje v řetězci transportu elektronů jako součást cytochromu c. To znamená, že se podílí na transportu proteinů a katalyzuje reakce. Jediným rozdílem mezi těmito dvěma molekulami jsou postranní řetězce připojené k uhlíkům 3 a 18. Postranní řetězec na uhlíku 8 zůstává stejný.

Metalo-porfyriny jsou široce používány v celé biosféře a hem (železnatý protoporfyrin IX) je jeden z nejužitečnějších a nejpoužívanějších (Poulos 2014).

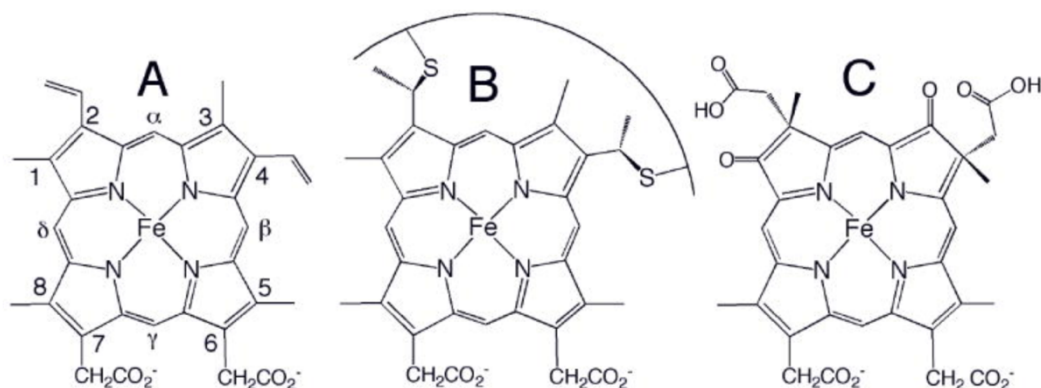
Hem je složkou různých biologických struktur, zejména hemoglobinu. Mezi další patří myoglobin, cytochromy, katalázy, hem peroxidáza a endoteliální syntáza oxidu dusnatého (Ogun 2019).

Hem je prostetická skupina, která je nezbytná k provádění různých biologických funkcí, jako je tvorba hemoglobinu a myoglobinu, proteinů, které slouží k přenosu a skladování kyslíku (Yuan et al. 2016). Jiné enzymy, které používají hem jako prostetickou skupinu jsou cytochromy elektronového transportního řetězce, katalázy a syntázy oxidu dusnatého. Hlavními tkáněmi pro syntézu hemu jsou erytrocyty kostní dřeně a hepatocyty jater. Biosyntéza hemu však probíhá ve všech buňkách těla (Ogun 2019).

Funkční všestrannost je také dána typem skupiny hemu, který je definovaný povahou substituentů na porfyrinovém makrocyklu (viz Obr. 18). Nejběžnějšími typy hemů jsou hem b a hem c. Hem b je železo-protoporfyrin IX a nekovalentně se váže na protein, zatímco hem c je charakterizován přítomností dvou kovalentních thioetherových vazeb, vytvořených mezi postranními řetězci a hemovými vinylovými skupinami (Bowman & Bren 2008).

Mezi další, méně obvyklé deriváty hemu, patří heme d_1 , přítomný v cytochromové cd_1 nitritové reductáze, hem a, který se nachází v cytochrom c oxidáze a související hem o, který se nachází v některých bakteriálních oxidázách (Allen et al. 2008).

Z chemického hlediska jsou struktury b a c navzájem velmi podobné, a proto se neočekává, že budou vykazovat významné inherentní rozdíly v elektronové struktuře nebo redukčním potenciálu. Z biosyntetického hlediska jsou však tyto typy hemů zcela odlišné, protože hem c je syntetizován z hemu b. Použití hemu c tak vyžaduje větší investici do organismu (Stevens et al. 2004).



Obrázek 18 Chemické struktury (A) hem b, (B) hem c a (C) hem d1. Křivka v (B) představuje peptidový segment. Hem o má hydroxyvinylovou skupinu namísto vinylu 2 v (A) a hem a má hydroxyfarnesylovou skupinu namísto vinylu 2 a formyl skupinu namísto methylu 8 (Stevens et al. 2004).

Základní jsou dvě funkce hemu (Lodish et al. 2000). Může vázat plyny, jako je kyslík a transportovat je v organismu. Speciální proteiny pak donutí hem uvolnit kyslík ve vhodnou dobu.

Dobrym příkladem proteinu tohoto typu je hemoglobin. Hemoglobin se nachází ve všech krevních buňkách, které vystavují hemovou skupinu krevní plazmě. Když tedy krevní buňky procházejí plicemi, váží tolik kyslíku, kolik dokáže železo v hemu zvládnout. Krevní buňky pak cestují do různých částí těla, jako jsou například svaly. Tyto buňky aktivně spotřebovávají kyslík a uvolňují oxid uhličitý jako vedlejší produkt. Kyslík ve svalových buňkách je vázán myoglobinem a transportován do mitochondrií. Myoglobin má také skupinu hemu, ale funguje jiným způsobem, takže kyslík zůstává vázán až do dosažení mitochondrií (Lodish et al. 2000).

Druhá funkce hemu je držení elektronů (cytochromy) a usnadnění reakcí v elektronovém transportním řetězci. Během oxidační fosforylace v mitochondriální membráně musí elektrony procházet řadou reakcí a získaná energie z těchto reakcí je uložena ve vazbách molekuly ATP, kterou většina organismů používá jako primární zdroj energie. Hemové skupiny v těchto cytochomech jsou odlišné od skupin v hemoglobinu, protože mají různé funkce a vážou se na různé proteiny (Lodish et al. 2000).

Všechny tkáně vyžadují hem pro cytochromy: hem *b* pro cytochromy *b₅*, *bb₆* a hem *c* pro cytochromy *a-a₃* (cytochrom oxidázy) a cytochrom *cc* (Moore 1998). Hem poskytuje katalytickou doménu v monooxygenázách (rodina cytochromu P450). V játrech, orgánu specializovaném na systémovou detoxikaci, se přibližně 65 % nově syntetizovaného hemu použije pro cytochrom P450.

Hem se vyskytuje v signálních transdukčních proteinech jako jsou: (i) syntázy oxidu dusnatého (endoteliální eNOS, indukovatelný iNOS a neuronální nNOS), které vytváří oxid dusnatý (NO) z L-argininu, a (ii) ruzpustné guanylátcyklázy (sGC), které generují cyklický 3'-5' monofosfát (cGMP) z Mg21-guanosin-trifosfátu (White & Marletta 1992).

Hem také může podporovat škodlivé reakce závislé na železe, vedoucí k tvorbě ROS a peroxidaci lipidů v buněčných membránách (Ryter & Tyrrell 2000).

1. Biosyntéza hemu

Syntéza hemu probíhá v cytosolu a v mitochondriích. Hem se může získat také přes střevní absorpci a při mezibuněčném transportu (Chung et al. 2012). Syntéza kyseliny 5'-aminolevulinové (ALAS) je enzymem pro syntézu hemu v jaterních a erytroidních buňkách. Existují dvě formy ALA syntázy, neerythroidní izozym ALAS1 a erythroidní specifický izozym ALAS2. Všechny buňky exprimují ALAS1, zatímco pouze játra a kostní dřeň exprimují ALAS2. Gen pro ALAS2 je na chromozomu X (Ogun 2019). Biosyntéza hemu se skládá z osmi kroků enzymatické cesty.

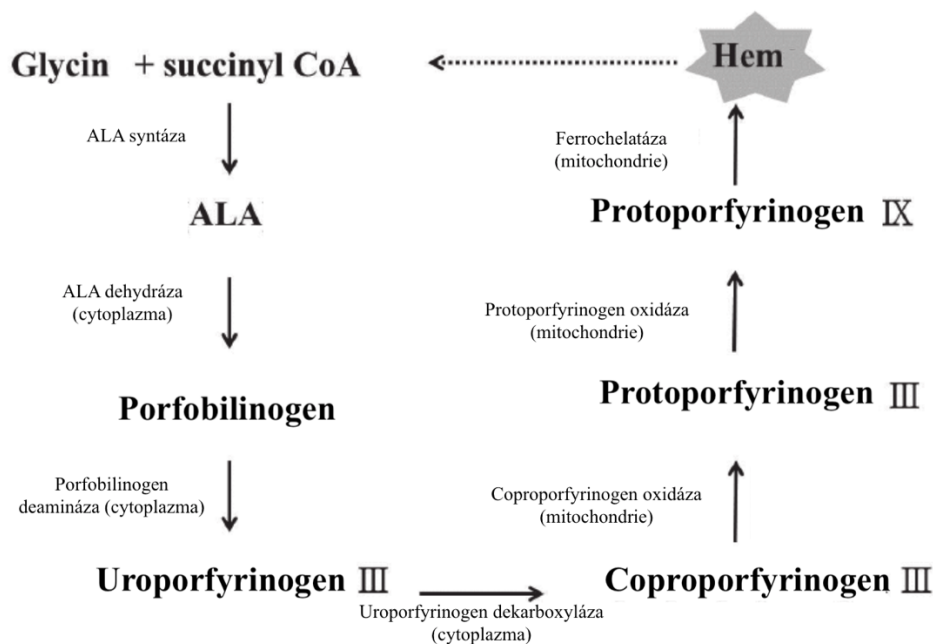
Hemová biosyntéza začíná v mitochondriích kondenzací sukcinyl Co-A z Krebsova cyklu a aminokyseliny glycinu. Kombinují se a vytvářejí klíčový hemový meziprodukt, 5'-aminolevulinovou kyselinu (ALA) v mitochondriích katalyzovaných syntázou kyseliny aminolevulinové (ALAS) (Fujiwara & Harigae 2015). Tato reakce je omezujícím krokem v rychlosti této biosyntézy (Zhang et al. 2017).

Molekuly ALA vystoupí z mitochondrie do cytosolu, kde se dvě molekuly ALA kondenzují za vzniku sloučeniny pyrrolového kruhu porfobilinogenu (PBG), katalyzovaného enzymem vyžadujícím zinek, enzymem dehydratázy ALA (také nazývaným syntáza porfobilinogenu). Další krok dráhy zahrnuje kondenzaci čtyř molekul porfobilinogenu, uspořádaných tak, že tvoří lineární hydroxymethylbilan (HMB), katalyzovaný porfobilinogen deaminázou (PBG deamináza) také známou jako hydroxymethylbilan syntáza (Ogun 2019).

Uzavřením lineárního HMB vzniká asymetrický pyrrolový kruh D, zvaný uroporfyrinogen III, katalyzovaný uroporfyrinogen-III syntázou. Tento krok je nezbytný, protože nesprávná tvorba kruhů porfyrinů vede k protoporfyrin. Po formaci správné formy uroporfyrinogenu III se modifikují postranní řetězce, katalyzovány uroporfyrinogen dekarboxylázou za vzniku koproporfyrinogenu III (Ryter & Tyrrell 2000).

Po jeho syntéze se koproporfyrinogen III transportuje do mitochondrií. Koproporfyrinogen III se poté dekarboxyluje enzymem koproporfyrinogen oxidázy za vzniku produktu protoporfyrinogenu IX (Ryter & Tyrrell 2000).

Nakonec se protoporfyrinogen IX konvertuje na protoporfyrin IX s použitím protoporfyrinogen oxidázy. Konečná reakce zahrnuje vložení železa do protoporfyrinu IX katalyzovaného enzymem ferrochelátázou vedoucí k tvorbě hemu (Kim et al. 2012). Železo vstupuje do hem cyklu, když mitochondriální ferrochelátáza včleňuje Fe^{II+} do protoporfyrinu IX (PPIX), generující protohem (ferroprotoporfyrin IX, PPIX-Fe(II)). Hem železo reverzibilně oxiduje na železitou formu, ferriprotoporfyrin IX, PPIX-Fe (III), která tvoří dva komplexy: hematin, PPIX-Fe(III)-OH a hemin, PPIX-Fe(III)-Cl (Ryter & Tyrrell 2000). Celý proces je znázorněn na Obr. 19.



Obrázek 19 Schématický diagram biosyntetické cesty hemu (Kim et al. 2015)

Syntéza hemu je biochemická cesta, která vyžaduje řadu kroků, substrátů a enzymů. Nedostatek enzymu nebo substrátu vede k hromadění meziproduktů syntézy hemu v krvi, tkáních a moči, což vede ke klinicky významným poruchám zvaných porfýrie. Porfýrie jsou jaterní nebo erytropoetické. Mohou být akutní nebo chronické, vést k neurologické dysfunkci, mentálnímu narušení nebo fotocitlivosti. Poruchy syntézy hemu po tvorbě hydroxymethylbilanu vedou k fotocitlivosti. Mezi další příznaky patří změna barvy moči, bolest břicha, břišní kolika, vysoce agitovaný stav, tachykardie, dýchací potíže, nauzea, zmatenost a slabost dolních končetin (Ogun 2019).

2. Degradace hemu

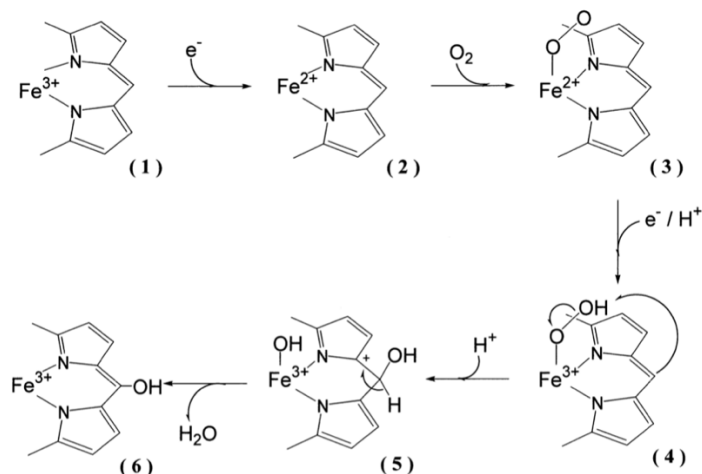
Enzymatická reakce degradace hemu vyžaduje molekulární kyslík O_2 a NADPH jako redukující ekvivalent a vede k tvorbě biliverdinu, uvolňování oxidu uhelnatého a železa.

HO-1 je jednoduchý protein, který nemá žádnou z prostetických skupin nezbytných pro aktivaci O_2 . Místo toho je aktivace O_2 prováděna substrátovým hemem a jeho dvěma meziprodukty, α meso-hydroxyheminem a verdohemem (Kikuchi et al. 2005).

První krok: přeměna hemu na α -meso-hydroxyhemin IX (viz Obr. 20)

Reakce degradace hemu začíná tvorbou komplexu železitého hemu (Fe^{3+}) a HO-1. Železitý hem je redukován do železnatého stavu (Fe^{2+}) darovaným elektronem z NADPH cytochrom P450 reduktázy (Kikuchi et al. 2005).

Molekulární kyslík se váže s komplexem za vzniku metastabilní oxy formy. Po přijetí protonu a dalšího elektronu z reduktázy se kyslík vázaný na železo přeměňuje na hydroperoxidový meziprodukt (Fe^{3+} -OOH). Hydroperoxid vázaný na železo útočí na α -meso uhlík v porfyrinovém kruhu a přeměňuje hem na železitý α – meso hydroxyhemin (Davydov et al. 1999).

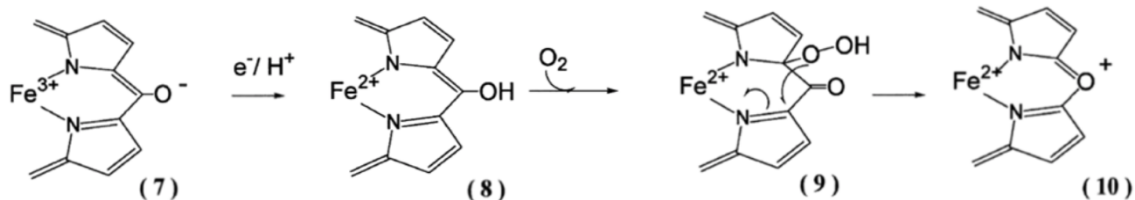


Obrázek 20 Mechanismus konverze hemu na α -meso hydroxyheminu pomocí HO-1 (1. železitý hem; 2. železnatý hem; 3. metastabilní oxy forma; 4. hydroperoxidový meziprodukt; 5., 6. přeměna hemu na α -meso hydroxyheminu) (Yoshida & Migita 2000)

Druhý krok: přeměna α -meso hydroxyheminu na α -verdohem (viz Obr. 21)

Železitý komplex α -meso hydroxyheminu a HO-1 je převeden na komplex α -verdohem a HO-1 v přítomnosti reduktázy a kyslíku (Yoshida & Migita 2000).

Kyslík je aktivován na okraji komplexu α -meso hydroxyheminu a HO-1 a tvoří meziprodukt α -hydroperoxy oxophlorin ($C_{36}H_{42}N_4O_5$), který je konvertován na železnatý α -verdohem za uvolnění CO (Yoshida & Migita 2000).



Obrázek 21 Mechanismus konverze α -meso hydroxyheminu na α -verdohem pomocí HO-1 (7. železitý α -meso hydroxyheminu po expozici kyslíkem; 8. železnatý α -meso hydroxyheminu po redukcii; 9. meziprodukt α -hydroperoxy oxophlorin; 10. α -verdohem) (Yoshida & Migita 2000)

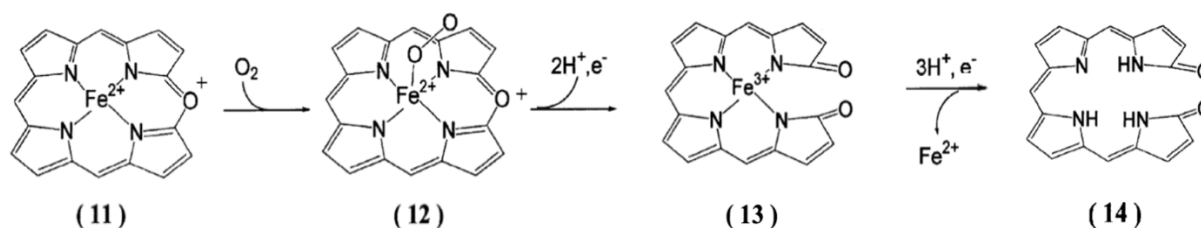
Třetí krok: Přeměna verdohemu na biliverdin (viz Obr. 22)

Konverze komplexu verdohemu a HO-1 na komplex železitého biliverdinu a HO-1 vyžaduje kyslík i redukující ekvivalenty (Wilks & Ortiz deMontellano 1993). Při absenci elektronů je komplex verdohemu a HO-1 degradován kyslíkem na neidentifikovatelnou sloučeninu, která neprodukuje biliverdin po přidání elektronů (Yoshida & Migita 2000).

Přestože neexistuje důkaz pro přítomnost komplexu oxy-verdohem a HO-1, usuzuje se, že molekula kyslíku se pravděpodobně váže na železo verdohemu a je aktivována mechanismem podobným tomu v prvním kroku. Vazba kyslíku na Fe^{2+} verdohemu se zdá být nepříznivá ve srovnání s vazbou na železitý komplex heme-HO-1. Vazba kyslíku by tedy mohla být procesem omezujícím rychlost třetího kroku (Yoshida & Migita 2000).

V přítomnosti redukujícího ekvivalentu může být komplex oxy-verdohemu a HO-1 přeměněn na železitý hydroperoxylový aktivní druh. Intramolekulární nukleofilní atak peroxylového kyslíku na jeden z oxa-uhlíků tvoří komplex, který se převádí na železitý

biliverdinový komplex redukcí a eliminací jednoho kyslíku jako molekuly vody. Produkt třetího kroku, komplex železo-biliverdin, je stále vázán na HO-1 protein. Pro uvolnění volného železa a biliverdinu k dokončení celkové HO reakce je Fe^{3+} biliverdinu dále redukováno do železného stavu reduktázou (Kikuchi et al. 2005).



Obrázek 22 Mechanismus konverze α -verdohemu na biliverdin (11. α -verdohem; 12. oxy-verdohem; 13. železitý biliverdin; 14. biliverdin) (Yoshida & Migita 2000)

V posledních krocích reakce mikrosomální enzym biliverdin reduktáza (BVR) přeměňuje biliverdin na bilirubin. Bilirubin není na rozdíl od biliverdinu rozpustný ve vodě, ale je lipofilní a může pronikat do buněčných membrán. Aby se stal ve vodě rozpustným, a proto vylučovatelným v gastrointestinálním traktu, musí být konjugován. To je regulováno UDP glukuronosyltransferázou 1A1 (UGT1A1), enzymem, který přidává dva glukuronidové zbytky k bilirubinu, aby byl ve vodě rozpustný. Vedlejší produkty degradace hemu zprostředkované HO-1 mohou mít pozitivní i negativní účinky na buněčnou funkci (Dennery 2012).

3.3.5 Produkty aktivity hem oxygenázy-1

Abychom pochopili funkci HO-1, musíme se podívat na produkty její činnosti. Při štěpení hemu uvolňuje HO-1 oxid uhelnatý, železo a biliverdin, který je následně přeměňuje na bilirubin. Každý z těchto produktů enzymatické aktivity hraje jedinečné a často ochranné role v těle.

3.3.5.1 Železo

Železo je zásadním ligandem prakticky ve všech typech buněk a je využíváno pro velké množství buněčných procesů, včetně tvorby ATP, přenosu kyslíku a detoxikace (Bothwell et al. 1995).

Normálně je střevem absorbováno kolem 1 mg železa a současně je z těla vylučováno přibližně stejné množství. Toto železo z potravy představuje pouze 1-3% železa, které se denně dodává do krve. Většina požadavku na železo je zajištěna reutilizací ze stávajících celkových tělních zásob, z nichž je asi 70 % udržováno v hemoglobinu (Bothwell et al. 1995).

Volné železo je silným oxidačním činidlem, které poškozuje buněčné makromolekuly, pravděpodobně reakcí s peroxidem vodíku za vzniku škodlivého hydroxylového radikálu (Halliwell & Gutteridge 1990). Je důležité porozumět metabolismu železa nejen na molekulární a buněčné úrovni, ale také na úrovni celého organismu.

Disociace železa z hemových skupin a následné uvolňování z buněk tvoří hlavní složku homeostázy železa. Katabolismus hemu uvolňuje Fe^{2+} , které vstoupí do buněčného LIP (labile iron pool), kde je železo dostupné pro buněčné procesy, například k syntéze hemoglobinu v erythrocytech, oxidačním a redukčním reakcím a proliferaci buněk (Ryter & Choi 2009). Zde

je slovem LIP označena zásoba železa, která je složena z obou ionických forem železa Fe^{2+} a Fe^{3+} , které jsou spojeny s organickými anionty, polypeptidy a komponenty membrán (Kakhlon & Cabantchik 2002).

Tato malá frakce obsahuje cytotoxický Fe^{2+} , který katalyzuje ROS jako je např. superoxid H_2O_2 na vysoce reaktivní hydroxylový radikál (Kohgo et al. 2008). Vysoké koncentrace železa se mohou chovat cytotoxicky a způsobují poškození buněčných proteinů, lipidů a DNA (Ryter & Choi 2006).

Z tohoto důvodu existují různé mechanismy pro snížení pro-oxidantního železa a zabránění akumulaci železa v buňkách. Když je volné železo uvolněno z katabolismu hemu může být neutralizováno různými metabolickými cestami, které jsou vyvolané samotným železem (Baranano et al. 2000).

Uvolněním železa z hemu pomocí HO-1 potenciálně přispívá k prooxidačnímu stavu v buňce. Železo uvolňované touto aktivitou však také zvyšuje syntézu ferritinu, který ukládá volné železo a má dobře známé cytoprotektivní vlastnosti. Část ochranného účinku indukce HO-1 lze přičíst nárůstu buněčného ferritinu (Balla et al. 2007).

Kromě toho může HO-1 potlačit expresi vysoce aktivního transportéru železa, který se podílí na odtoku železa z buněk. V nepřítomnosti HO-1 může být tok železa z buněk snížen a může potenciálně přispívat k buněčné smrti (Ferris et al. 1999).

Myši s delecí genu *HMOX1* vykazují zvýšenou tkáňovou a intracelulární akumulaci železa, což podporuje tvrzení, že regulace ferritinu a transportního proteinu železa může přispět k buněčné ochraně pomocí HO-1 (Morse & Choi 2005).

3.3.5.2 Oxid uhelnatý

Oxid uhelnatý (CO) je bezbarvý, neiritující plyn, který je vysoce toxický. Je generován z neúplného spalování uhlovodíků. Typickým zdrojem CO jsou plyny z automobilů, spalovacích spotřebičů jako topení, z pálení olejů, uhlí, dřeva a dalších paliv. Koncentrace v nižší atmosféře je méně než 1ppm, nicméně tyto koncentrace mohou dosáhnout na 20 ppm v osídlených oblastech, které jsou velice znečištěné. Dále je CO produkovaný endogenně například degradací hemu (Ryter et al. 2002).

Endogenně produkovaný CO se chová jako signální molekula, která je zapojena do mnoha funkcí jako jsou protizánětlivé reakce, proliferace a apoptóza (Němeček et al. 2017). Například CO je jako oxid dusnatý (NO) definován jako plynný neurotransmitter v centrální nervové soustavě (Piantadosi 2008).

CO je aktivátor guanylát cyklázy (sGC), která je odpovědná za formaci cyklického guanozin 3', 5'-monofosfátu (cGMP). CO odvozený od HO-1 se podílí na mnoha vaskulárních procesech, jako relaxace VSMC, proliferace VSMC a agregace krevních destiček (Ryter et al. 2006).

CO je také zapojený v modulaci MAPK signální kaskády zahrnující p38 MAPK, ERK a JNK dráhy. Navíc CO zprostředkovává protizánětlivé, proti proliferativní a antiapoptotické efekty, které jsou závislé na modulaci p38 MAPK signální kaskády, zatímco někdy může inhibovat ERK dráhu (Ryter & Choi 2009).

Dále má CO cytoprotektivní efekt, který je pravděpodobně přičítán jeho schopnosti interagovat s divalentními kovy jako je Fe^{2+} v prostetické skupině hemu v hemoproteinech (Ryter & Choi 2009).

Jiný možný hemoprotein, cytochrom c oxidáza, je terminální akceptor v mitochondriálním transportu elektronů. Vystavením CO, buňky uvolňují malou dávku mitochondriální ROS, což je podle všeho z důvodu navázání CO na hem skupinu v cytochrom c oxidáze. Následkem toho může tento proces spustit aktivaci další signální transdukční cesty zahrnující p38 MAPK signální kaskádu a HIF-1 (Zuckerbraun et al. 2007).

CO také poskytuje antioxidantní ochranu. Různé studie ukázaly, že administrací exogenního CO se nejen prodlužuje přežitelnost myši v hyperoxii, ale také se inhibuje vznik markerů pro plicní zranění jako je hemoragie a edém. V experimentálně fotochemicky vyvolaných vaskulárních zranění, spojených s *HMOX1*^{+/+} a *HMOX1*^{-/-} u myši, inhalace CO a administrace bilirubinu zachránila pro-trombotický fenotyp *HMOX1*^{-/-} myši (True et al. 2007).

3.3.5.3 Biliverdin

Biliverdin (BV) je zelený pigment, který je transformován pomocí BVR na bilirubin (BR), což je hydrofobní žlutý pigment. BR je lipofilní lineární tetrapyrrol, který je formován při katabolismu hemu pomocí HO-1. BR je potencionálně cytotoxický odpadní produkt rozpustný v tucích a normálně je rychle konjugován kyselinou glukuronovou pro exkreci v moči (Ryter 2012).

BV a BR reagují s enzymaticky generovanými superoxidovými radikály in vitro. Antioxidantní vlastnosti BV a BR byly demonstrovány v různých in vivo a in vitro studiích. BV reaguje přímo proti radikálům peroxidu, které byly generovány chemicky v homogenním roztoku nebo multilamelárních liposomech, zatímco BR je považován za antioxidant rozštěpující řetězce v peroxidaci membránových lipidů (Ryter et al. 2006).

BR chrání buňky proti cytotoxicitě H_2O_2 in vitro (Clark et al. 2000). Navíc má BR proti zánětlivé a proti apoptotické vlastnosti. Inhibice produkce BR specifickými siRNA proti BVR, zvýšilo intracelulární hodnoty reaktivních kyslíkových druhů (Baranano et al. 2002). Navíc jak bylo ukázáno u modelu myši, indukce *HMOX1* pomocí hemu uděluje protizánětlivou ochranu proti oxidativnímu stresu (Ryter et al. 2006).

Cytoprotektivní účinky BV a BR pravděpodobně přispívají k prospěšným účinkům HO-1 v mnoha modelech onemocnění. Například při exogenním podání, BV a BR vykazovaly protizánětlivé, antiapoptotické, antiproliferační a antioxidantní vlastnosti, které mohou poskytnout ochranu před poraněním I/R, odmítnutím transplantovaných orgánů a těžkou sepsí, stejně jako vaskulárními lézemi spojené s vývojem intimální hyperplazie (Ollinger et al. 2005).

3.3.6 Funkční role HO-1

3.3.6.1 Role v reutilizaci železa

Převážná část celkového tělesného železa je obsažena v buněčných hemových skupinách. Dva příznaky spojené s deficitem HO-1, hypoferremie a ukládání železa ukazují, že katabolismus hemu zprostředkovaný pomocí HO-1 je součástí fyziologické homeostázy (Balla et al. 2007).

Jsou popsány dva odlišné buněčné mechanismy pro použití katabolizovaného hemového železa. Jedna cesta je závislá na HO-1, kde volné železo uvolněné z hemu se relativně účinně uvolňuje do extracelulárního prostoru. Zdá se, že druhá cesta katabolismu hemu, která je nezávislá na HO-1 generuje volné železo, které je predominantně zaváděno do intracelulárních zásob, jako je feritin (Maines 1997).

Izoforma HO-2 je zřejmým kandidátem pro provádění hematokatalytické dráhy nezávislé na HO-1. HO-2 se hlavně liší od HO-1 svou regulací, protože není indukován hemem nebo oxidačním stresem, ale ve většině hlavních orgánů je konstitutivně exprimován na relativně vysokých hladinách (Poss et al. 1995).

Myš *HMOX*^{-/-} představuje zvířecí model pro poruchy způsobené přetížením železem u člověka. Parenchymální zatížení železem, které vykazují zvířata *HMOX1*^{-/-}, má vysokou podobnost s dědičnou hemochromatózou, která je způsobena mutací genu hlavního histokompatibilního komplexu třídy I (Feder et al. 1996).

Zajímavé je, že příznaky myši *HMOX1*^{-/-} jsou podobné příznakům pacientů s anémií chronického zánětu, kteří také vykazují hypoferremii se zvýšením zásob feritinu v séru a železa v tkáni (Means & Krantz 1992).

Aktivita HO-1 je silně regulovaná zánětlivými cytokiny (Kutty et al. 1994) a zdá se, že tento enzym je důležitý pro zachování hladin železa v séru a snížení zánětu. Je možné, že v průběhu chronických zánětlivých onemocnění je cesta uvolňování železa zahrnující HO-1 omezená. Modulace aktivity HO-1 může být novým terapeutickým přístupem ke zlepšení hladin železa v séru a ke snížení rozsahu zánětu u chronicky nemocných pacientů (Poss & Tonegawa 1997).

3.3.6.2 Neuroprotektivní role

Fungování mozku je do značné míry závislé na dodání kyslíku, protože mozek spotřebovává velké procento (až 50 %) celkového kyslíku dodávaného do těla. Za normálních fyziologických podmínek se však 2–5 % celkového kyslíku spotřebovaného buňkami transformuje na reaktivní druhy kyslíku (ROS). Pokud však dochází k nadměrné a neregulované produkci ROS v centrálním nervovém systému (CNS), vede to k několika neurodegenerativním onemocněním, jako je Parkinsonova choroba (PD), Alzheimerova choroba (AD), Huntingtonova choroba (HD) a amyotropní laterální skleróza (ALS) (Liu et al. 2017).

Objevují se důkazy, že HO-1 pomáhá v prevenci patogeneze různých neurodegenerativních chorob. Bylo zjištěno, že indukce HO-1 implikuje neuroprotektivní roli při vystavení celé řadě škodlivých podnětů, a to jak ve zvířecích modelech, tak v tkáňové kultuře (Liu et al. 2017).

K indukci HO-1 dochází jak v neuronech, tak v ostatních mozkových buňkách. Astrocyty vykazují silnější odpověď HO-1 než neurony (Chen 2014).

Mnoho studií popisuje ochrannou roli HO-1 proti různým neurodegenerativním poruchám. Cerebelární granulované buňky transgenních myši s nadměrnou tvorbou HO-1 v neuronech byly relativně rezistentní vůči buněčné smrti zprostředkované oxidačním stresem (Chen et al. 2000). Když byla HO-1 nadměrně produkována v neuronálních buňkách, bylo zjištěno, že se stanou rezistentní na oxidační poškození vyvolané glutamátem a H₂O₂. HO-1

také při nadměrné expresi chrání neurony před toxicitou indukovanou 1-methyl-4-fenylpyridiniem (MPP) (Hung et al. 2008).

Indukce HO-1 ovlivňuje také další parametry. Například u kortikálních astrocytů potkanů se zdá, že aktivita HO-1 souvisí s úrovní produkce prostaglandinu E2 (Vairano et al. 2001). Naopak snížení aktivity HO-1 zvyšuje náchylnost k oxidačním a jiným stresovým výzvám. Bylo zjištěno, že astrocyty odebrané z knockout myši v genu *HMOX1*, vykazují větší zranitelnost vůči toxicitě vyvolané heminem ve srovnání s buňkami divokého typu (Chen-Roetling & Regan 2006).

3.3.6.3 Role v kardiovaskulárním systému

Výskyt kardiovaskulárních chorob je velice vysoký. Ewing a jeho spolupracovníci poprvé prokázali primární funkci HO-1 při udržování srdeční homeostázy při pozorování zvýšené exprese HO-1 v srdci v reakci na hypertermii (Ewing et al. 1994).

Ve studiích u myši s knockoutem genu *HMOX1* (*HMOX1*^{-/-}), hypoxie navozuje ve srovnání s myši divokého typu závažnou dilataci a infarkt pravé komory (Yet et al., 1999).

Kromě toho mnoho studií využívajících specifické transgenní myši modely odhalilo snížený počet infarktu myokardu po poškození v důsledku nadměrné exprese *HMOX1* (Yet et al. 2001). Nadměrně exprimovaný *HMOX1* navíc v modelu srdečního selhání podporuje neovaskularizaci a zlepšuje apoptózu (Wang et al. 2010).

HO-1 je také nutný pro angiogenní funkci progenitorových buněk odvozených z kostní dřeně (Grochot-Przeczek et al. 2014) a poskytuje ochranu před kardiovaskulárními chorobami (Pirro et al. 2009).

HO-1 hraje důležitou roli při endoteliální opravě a ochraně cév (Lin et al. 2009), a tak poskytuje zajímavý terapeutický potenciál pro endoteliální progenitorové buňky (EPC) (Bianconi et al. 2018).

3.3.6.4 Role v ledvinách

Při akutním poškození (AKI) a chronickém onemocnění ledvin (CKD) hraje HO-1 důležitou roli. Reguluje oxidační stres a má ochranný účinek (Lever et al. 2016).

Poškození vedoucí k buněčnému stresu destabilizuje intracelulární proteiny hemu a vede k tvorbě reaktivních druhů kyslíku (ROS) a peroxidaci lipidů. Při poškození ledvin má oxidační stres za následek destabilizaci intracelulárních hemových proteinů, poškození organel a smrt buněk. HO aktivita je prospěšná při oxidačním stresu díky produkci antioxidantu bilirubinu (Hull & Agarwal 2014) a vazodilatačního CO (Hoetzel et al. 2007), které jsou protizánětlivé.

Existuje mnoho důkazů o důležitosti HO-1 při udržování homeostázy v přítomnosti oxidačního stresu a podílení se na patofyziologii mnoha orgánových systémů (Lever et al. 2016).

Ledviny se setkávají s endogenními i exogenními toxiny i vázanými železem z oběhu. Oxidační stres vyvolaný volným hemem je důležitým fyziologickým mechanismem indukce HO-1. Kromě toho nehemové molekuly, jako jsou těžké kovy, endotoxin, UV záření,

prostaglandiny, H_2O_2 , určité růstové faktory, cytokiny a další stimuly mohou indukovat HO-1 v ledvinách (Sikorski et al. 2004).

Byly vyvinuty rekombinantní zvířecí modely ke studiu úlohy HO-1 v různých biologických procesech ledvin. HO-1 je indukován ve zvířecích modelech ischemie, hypertenze, glomerulonefritidy, akutního a chronického onemocnění ledvin (Lever et al. 2016).

Hemem indukovaná exprese HO u hypertenzních potkanů snižuje krevní tlak. CO, jeden z produktů reakce HO, reguluje cévní tonus. Působení CO v relaxaci vaskulárního tónu je obzvláště důležité v modelu diabetického onemocnění ledvin, které se vyznačuje nízkou biologickou dostupností NO v ledvinách. CO zprostředkovává vazodilatorní účinky syntézou cGMP, aktivací K^+ kanálů a blokadou vazokonstrikčního endotelinu-1. Produkce CO pomocí HO stimuluje angiogenezi. Rovněž je protizánětlivý, antiapoptotický, antitrombotický a vykazuje antioxidační vlastnosti (Kim et al. 2011).

Souhrnně lze funkci enzymového systému HO-1 v patofyziologii onemocnění ledvin shrnout v několika bodech. (i) HO-1 je indukován v ledvinách jak u zvířecích modelů, tak u lidí s různými onemocněními ledvin; (ii) Hladiny exprese HO-1 určují průběh onemocnění ledvin - nedostatek nebo inhibice HO-1 u zvířecích modelů zhoršuje renální strukturu a funkci a zvýšená exprese je ochranná; (iii) hladiny HO-1 v plazmě a moči byly zahrnuty jako biomarkery pro AKI u zvířecích modelů i lidí; (iv) polymorfismy v lidském promotoru HO-1 korelují s expresí HO-1 a výsledky u několika onemocnění ledvin; v) mnoho farmakologických intervencí používaných v předklinických modelech onemocnění ledvin (erythropoetin, IL-10) jsou silnými induktory HO-1 a zprostředkovávají jejich účinky, alespoň částečně, prostřednictvím indukce HO-1; a (vi) probíhá několik klinických studií zaměřených na dráhu HO-1 v ledvinách. Proto enzymový systém HO-1 představuje důležitý cíl pro zásah do patogeneze akutní a CKD (Lever et al. 2016).

3.3.6.5 Role v játrech

Akutní a chronická onemocnění jater, včetně akutního selhání jater, alkoholické nebo virové hepatitidy, chronického zánětu, fibrózy, cirhózy a hepatocelulárního karcinomu, jsou život ohrožujícími onemocněními, které mohou vést až k nutnosti transplantace jater. HO-1 a jeho reakční produkty degradace hemu jsou spojeny s cytoprotekcí. Typickým příznakem nedostatku HO-1 u člověka a je depozice železa v játrech, oxidační poškození spojené s anemií, poškození tkání a chronické záněty (Sass et al. 2012).

Indukce HO-1 nebo aplikace jejích produktů u zvířecích modelů má příznivé účinky při akutní hepatitidě a sepse. V myším modelu akutního zánětlivého poškození jater indukce HO-1 snížila expresi cytokinů, chránila myši před poškozením jater a prodloužila přežití (Sass et al. 2004). Podobné účinky byly pozorovány u myši a potkanů při sepsi (Tsoyi et al. 2009).

Všechny tři produkty degradace hemu, tzn. CO, železo a bilirubin, jsou spojeny s cytoprotekcí a mají částečný vliv na zánětlivé procesy. Aplikace CO neinterferovala s uvolňováním cytokinů v myším modelu imunitně zprostředkovaného poškození jater, ale byla schopna potlačit hepatocelulární apoptózu (Sass et al. 2004). Avšak exprese HO-1 je indukovatelná exogenním CO, což naznačuje, že pozorované protizánětlivé reakce CO by mohly být sekundárním účinkem zprostředkovaným indukcí HO-1 (Lee et al. 2006).

Druhý produkt biliverdin podobně jako CO neinterferoval s uvolňováním cytokinů ve stejném modelu, ale kombinace CO a biliverdinu potlačovala produkci cytokinů (Sass et al. 2004).

Železo jako produkt HO-1 může hrát také významnou roli při zánětu jater. Kupfferovy buňky, které produkují prozánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-6), hrají také klíčovou roli při recyklaci železa. Masivní vychytávání hemu např. během sepse vede k indukci HO-1 u makrofágů. HO-1 je schopen potlačit uvolňování cytokinů z těchto makrofágů a tím regulovat imunitní reakci. Na druhou stranu aplikace Fe²⁺ na Kupfferovy buňky zvyšuje uvolňování TNF- α , což je připisováno aktivaci promotoru IKK a NF-kB. Navíc železo získané z hemu je primárním zdrojem Kupfferových buněk pro aktivaci Nf-Kb a expresi prozánětlivých genů jako je TNF- α a IL-6 (She et al. 2002).

U chronického zánětu je prokázáno, že indukce HO-1 interferuje s aktivací Kupfferových buněk a uvolňováním TNF- α (Mandal et al. 2010). Příznivé účinky indukce HO-1 byly popsány ve studii, kde nedostatek transportéru Mdr2 u myši má za následek akumulaci cholesterolu a fosfatidylcholinu a tím dochází k chronickému zánětu a fibróze. Protizánětlivý účinek indukce HO-1 byl spojen se snížením celkového počtu jaterních leukocytů, makrofágů a neutrofilních granulocytů (Mauad et al. 1994). Tato indukce HO-1 je schopna interferovat s chronickým zánětem, jeho progresí na fibrózu a také řeší již existující fibrózu.

Existuje také škodlivý vliv HO-1 a to hlavně při karcinogenezi, pokud je nadměrně exprimován v nádorových buňkách. Je zjištěno, že HO-1 se nadměrně tvoří v různých typech rakoviny. Tato exprese dává výhodu nádorovým buňkám pro přežití. Tato hypotéza je podpořena pozorováním, kdy inhibice exprese aktivity HO-1 podporuje apoptózu v buňkách rakoviny jater in vivo i in vitro. Docházelo ke zvýšenému poškození nádorových buněk a apoptóze, snížení proliferace, snížení růstu HCC (hepatocelulární karcinom) a snížení angiogeneze (Sass et al. 2008).

Antiapoptotické vlastnosti HO-1 jsou hlavně přisuzovány jeho produktu CO. CO přímo ovlivňuje jaterní apoptózu. Ukázalo, že HO-1 a CO chrání primární hepatocyty proti apoptóze indukované superoxydy (Berberat et al. 2003).

Chronická infekce viry hepatitidy B a C je hlavní příčinou škodlivých a progresivních zánětlivých procesů v játrech, které často vedou k hepatocelulárním karcinomům. Indukce nebo nadměrná exprese HO-1 je schopna interferovat s HBV i s replikací HCV (Protzer et al. 2007). Indukce HO-1 potlačila replikaci HBV přímo v hepatocytech a posttranskripčním kroku tím, že snížila stabilitu jadrového proteinu HBV a tím doplňování HBV cccDNA (kovalentně uzavřená kruhová DNA) (Protzer et al. 2007). Během infekce HCV byla zvýšena exprese HO-1 a snížena exprese transkripčního faktoru Bach1 (Ghaziani et al. 2006). HO-1 je však snížena v buněčných liniích, které exprimují základní protein HCV. Jadrový protein HCV je tedy zodpovědný za regulaci HO-1 v infikovaných buňkách (Wen et al. 2008).

Klíčový význam HO-1 jako ochranného enzymu byl prokázán v důsledku jeho nedostatku. To má za následek výraznou atrofii hepatocytů, prominentních Kupfferových buněk a makrofágů s ložisky železa (Kawashima et al. 2002). U zvířecích modelů se ukázalo, že HO-1 vykazuje širokou škálu hepatoprotektivních účinků. Ačkoliv je HO-1 indukovatelný různými stresovými stimuly, nejsou k dispozici žádné specifické induktory, které by mohly být použity pro klinickou terapii. Induktory používané ve studiích na zvířatech nejsou vhodné pro

použití u pacientů (Sass et al. 2012). Nicméně HO-1 a jeho produkty nesou velký léčebný potenciál, který může být převeden na terapii u lidí.

3.3.6.6 Role při karcinogenezi

Navzdory prospěšnému mechanismu cytoprotekce pomocí HO-1 v různých stresových podmínkách, je jeho indukce spojena s vývojem několika nemocí (Prawan et al. 2005).

Ve své roli, která spočívá v poskytnutí ochrany buňkám bylo pozorováno, že HO-1 zvyšuje přežití a potlačuje apoptotické dráhy v těchto buňkách (Abdalla et al. 2015). Zvýšené přežití a potlačení apoptózy může vést k jejich nekontrolované proliferaci, a tak vést k pokroku směrem ke karcinogenezi, metastázím a dalším onemocněním (Nitti et al. 2017).

HO-1 působí jako cytoprotektivní látka v normálních tkáních vystavených různým podnětům. Je indukován v reakci na celou řadu podnětů včetně karcinogenů a jeho zvýšená exprese dodává buňkám ochranu. Mnoho údajů získaných do dnešní doby uvádí zvýšenou expresi enzymu HO-1 v nádorech, ve srovnání s okolními normálními tkáněmi. Tato zvýšená exprese HO-1 byla odhalena u lymfosarkomu, adenokarcinomu, hepatomu, glioblastomu, melanomu, rakoviny prostaty, Kaposiho sarkomu, skvamózního karcinomu, rakoviny slinivky a mozkových nádorů (Nitti et al. 2017).

Expresi HO-1 může být zvýšena v reakci na dimethylaminoazobenzen (DAB) indukující jaterní karcinogenezi. Navíc indukce HO-1 může také probíhat v reakci na některé chemopreventivní sloučeniny. Například diallyl sulfid (DAS) zvyšuje expresi HO-1 zvýšenou tvorbou ROS a následným zvýšením aktivity transkripčních faktorů Nrf2, extracelulární signálně regulované kinázy (ERK) a p38 kináz (Gong et al. 2004).

Indukce enzymu HO-1 geneticky nebo pomocí farmakologických induktorů byla navržena tak, aby poskytovala prostředí nádorovým buňkám a propůjčovala rezistenci vůči chemoterapii a radioterapii. Kromě toho, HO-1 chrání tyto buňky před oxidačním stresem svým antioxidantním mechanismem (Nitti et al. 2017). Toto zvýšené přežití je pravděpodobně způsobeno antiapoptotickou vlastností HO-1 a zvýšenou angiogenezí (Dulak et al. 2008).

Antiapoptotický aspekt HO-1 byl dříve prokázán jak v in vitro, tak v in vivo modelech zánětů a nádorů. Je známo, že HO-1 brání apoptóze hlavně aktivací p38 kinázové dráhy. U mnoha karcinomů je však apoptóze zabráněno zapojením Akt / protein kinázy B (Goswami et al. 2006).

Jedna další studie ukázala, že nadměrná exprese HO-1 chránila rakovinné buňky ledvin před apoptózou indukovanou rapamycinem a sorafenibem a pomohla nádorovým buňkám růst tím, že blokovala jejich apoptotické a autofagické dráhy. Kromě toho bylo publikováno, že když je HO-1 nadměrně exprimován, zvyšuje expresi antiapoptotického proteinu Bcl-xL a snižuje expresi autofagických proteinů Beclin-1 a LC3B-II. Ale při knockdownu HO-1 se snižuje exprese Bcl-xL a výrazně zvyšuje LC3B-II (Banerjee et al. 2012).

Indukce HO-1 neochrání buňky vždy před apoptózou, jak se dříve myslelo. Studie prokázaly, že HO-1 nebyl schopen zabránit apoptóze vyvolané chemoterapií v modelu karcinomu prsu (Andreadi et al. 2006).

HO-1 také hraje klíčovou roli v angiogenezi. Angiogeneze je nezbytný proces pro trvalý růst a invazi nádorů. V kultivovaných endoteliálních buňkách bylo prokázáno, že zvýšené hladiny HO-1 se podílejí na regulaci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a

receptory VEGF zvyšovaly proliferaci a migraci endoteliálních buněk a podporovaly angiogenezi. Na druhou stranu inhibitor HO-1 (mesoporfyrin cínu) přechodně zpomalil růst nádoru (Jozkowicz et al. 2003).

Inhibice HO-1 je novým cílem v boji proti rakovině (Nitti et al. 2017). Například v buněčné linii odvozené od chronické myeloidní leukémie K562 byla proti apoptóze použita nadměrná exprese HO-1. Účinnost takové léčby byla také potvrzena na modelech in vivo (Mayerhofer et al. 2004).

U adenokarcinomických myší, které byly léčeny fotodynamickou terapií, byl růst nádorů do značné míry pozorován díky zvýšené expresi HO-1 (Nowis et al. 2006). Bylo pozorováno, že kurkumin indukuje expresi HO-1, a tak utlumuje jeho antiinvazivní účinek při léčbě rakoviny. Účinek HO-1 na expresi rakovinově kritických genů (onkogenů a tumor supresorových genů) by významně pomohl pochopení vztahu mezi aktivací HO-1 a patogenezi různých nemocí. Bohužel je však o této záležitosti k dispozici jen velmi málo údajů (Momtazi et al. 2016).

Jedna zpráva však ukazuje, že HO-1 neovlivňuje telomerázovou reverzní transkriptázu (TERT), která hraje hlavní roli v progresi rakoviny regulací telomerázy. Studie knockdown HO-1 nebo zvířecí modely léčené farmakologickými inhibitory HO-1 navíc pomohou při stanovení skutečného účinku aktivity HO-1 na progresi různých nemocí a rakovin a naopak, tj. účinku těchto nemocí na expresi HO-1 (Ghattas et al. 2002).

Dřívější studie spojily gen HO-1 (GT) n opakující se polymorfismus s rizikem rakoviny (Murakami et al. 2012). Kratší (GT) opakování byla spojena s nízkým rizikem různých lidských rakovin, jako je karcinom jícnových skvamocelulárních buněk, plicní adenokarcinom, rakovina prsu, karcinom skvamózních buněk ústní dutiny, adenokarcinom žaludku a maligní mezoteliom (Murakami et al., 2010). Některé zprávy však spojují kratší (GT) opakování s vyšším rizikem rakoviny u rakoviny slinivky, melanomu a rakoviny žaludku (Sawa et al. 2008).

3.3.6.7 Role v reprodukci a embryonálním vývoji

Vaječník je vysoce organizovaný kompozit zárodečných buněk (oocytů) a somatických buněk (granulosa, buňky theky a stromální buňky), jejichž interakce diktují tvorbu folikulů obsahujících oocyty, vývoj oocytů, ovulace a tvorba corpus luteum. Mnoho dějů u dospělých vaječníků je řízeno dvěma hormony, folikuly stimulujícím hormonem FSH a luteinizačním hormonem LH, vylučovanými z přední hypofýzy pod kontrolou pulzů hormonu GnRH (gonadotropin releasing hormone) v hypotalamu (Richards & Pangas 2010).

Hem oxygenáza, která katalyzuje degradaci hemu a tvorbu oxidu uhelnatého, lokalizována v přední hypofýze potkanů mění sekreci gonadotropinů a prolaktinu (Alexandrea & Lawson 2003). Hem oxygenáza lokalizována ve vaječníku potkana má možnou stimulační roli při produkci ovariálních steroidů skrz endogenní CO (Alexandrea & Lawson 2003).

Oocyty po dosažení profáze prvního meiotického dělení zůstávají po dlouhou dobu zastaveny. Toto zastavení je nezbytné pro diferenciaci oocytů. Chromosomy v profázi I jsou organizovány do bivalentů. Vytváření bivalentů vyžaduje kondenzaci a zhutňování chromozomů. Tento proces představuje významné omezení genové exprese (Costa et al. 2016).

Konfigurace chromatinu v zárodečném váčku (GV) prochází dynamickými změnami během růstu oocytů, ale přesto je známo jen málo mechanismů regulujících remodelaci chromatinu v oocytech. Doprovodné granulózní buňky hrají roli v modulaci konfigurace chromatinu a následné transkripční aktivitě v genomu oocytů (De La Fuente & Eppig 2001).

Oocyty byly v této práci použity pro zjištění potřebného množství oocytů nutného pro úspěšnou izolaci RNA pomocí izolačního kitu používaného v laboratořích Katedry genetiky a šlechtění.

Přestože se HO-1 podílí hlavně na udržování (recyklace, homeostázy) železa, studie prokázaly, že je spojen s řadou těhotenských poruch u lidí.

Například v lidské populaci bylo zjištěno, že hladina exprese *HMOX1* byla snížena v případech opakovaných potratů, spontánních potratů, hypertenze vyvolané těhotenstvím, preeklampsie, vrozených vad a omezení růstu plodu (Bainbridge & Smith 2005). Ukázalo se, že HO-1 hraje prospěšnou roli při udržování zdravého těhotenství a že komplikace během těhotenství mají souvislost s nedostatkem tohoto enzymu nebo nízkou expresí genu *HMOX1* na straně matky.

I když je studium genů důležité v oblasti lidské embryologie, nejsou takové studie vždy možné kvůli zjevným omezením použití lidí v experimentálním systému a dostupnosti lidských embryí pro vědecký výzkum. Proto je lidská embryologie rozsáhle studována pomocí různých druhů jako experimentálních modelových systémů (Gilbert 2003).

Myši jsou vhodným modelem pro studium embryologie, protože většina aspektů myší embryogeneze se podobá aspektům lidským. Je však nutné poznamenat, že vývoj u myší se také liší v několika důležitých aspektech od vývoje u lidí (Gilbert 2003).

Geneticky manipulované transgenní a knock-out myší linie jsou zvířecími modely, které mohou definovat fyziologickou funkci genů během embryonálního vývoje. Ve skutečnosti je smrt časného embrya často spojena s narušením základních buněčných funkcí. Například ve studii provedené O'Malleyovou a kol., myši s nedostatkem progesteronového receptoru rostly normálně až do dospělosti, ale vykazovaly významné defekty v několika reprodukčních tkáních (Lydon et al. 1995).

V jiné studii bylo prokázáno, že u myší postrádajících cykloogenázu-2 došlo k mnohočetným defektům v samičích reprodukčních procesech, včetně neschopnosti ovulace, selhání oplodnění a implantace, které jsou všechny spojeny s hladinou exprese *HMOX1* (Ejima & Perrella 2004).

Generace myší s mutací v genu *HMOX1* odhalila klíčovou roli *HMOX1* v homeostáze železa, jakož i v těhotenství a embryonálním vývoji. V těchto studiích byla linie *HMOX1*^{-/-} myší vyvinuta nahrazením exonu 3-5 genu *HMOX1* za sekvenci rezistence na neomycin (Poss & Tonegawa 1997). Když byly myši *HMOX1*^{-/-} kříženy, neprodukovaly životaschopné potomky. Když však byly myši *HMOX1*^{+/-} kříženy, životaschopnost potomstva *HMOX1*^{-/-} byla extrémně nízká (~5 %) ve srovnání s očekávanými Mendelovými segregáčními poměry (25 %). Kromě toho byli jedinci *HMOX1*^{-/-} mírně menší než vrhy *HMOX1*^{+/+} a *HMOX1*^{+/-} vrhu od narození a v průběhu rané dospělosti. Již ve věku 25 týdnů mají myši *HMOX1*^{-/-} tendenci být štíhlé, špatně vypadající a neplodné a zdálo se, že jsou méně aktivní než myši *HMOX1*^{+/+} a *HMOX1*^{+/-} (Otterbein et al. 2000).

Tato pozorování naznačují, že *HMOX1* hraje zásadní roli v udržení úspěšného těhotenství.

3.3.6.8 Role v angiogenezi

Formování nových krevních cév je přísně regulováno a závisí na aktivitách různých růstových faktorů a jejich receptorů. Je to proces, který začíná v časném embryonálním vývoji a pokračuje s omezeními v postnatálním životě (Dulak et al. 2004).

Obecně existují tři mechanismy tvorby a remodelace nových krevních cév, které se označují jako vaskulogeneze, angiogeneze a arteriogeneze (Carmeliet 2004).

Vaskulogeneze označuje tvorbu krevních cév de novo endotelovými progenitorovými buňkami, které vznikají z různých embryonálních oblastí nebo z dospělé kostní dřeně. Angiogeneze označuje vznik nových kapilárních větví z již existujících krevních cév. Arteriogeneze je definována jako remodelace již existující cévy za účelem zvýšení jejího lumenálního průměru v reakci na zvýšení průtoku krve (Carmeliet 2004).

Hlavním mediátorem angiogeneze je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Během vývoje je hladina VEGF rozhodující pro zdravý růst. V dospělosti je syntéza VEGF silně indukována řadou podnětů jako je hypoxie, cytokiny, růstové faktory, oxid dusnatý a reaktivní druhy kyslíku (Ferrara et al. 2003).

Hypoxie je silným induktorem exprese HO-1. Zapojení HO-1 do tvorby krevních cév bylo prokázáno u nádorů, ran a v různých experimentálních modelech angiogeneze. Nadměrná aktivita HO-1 podporuje růst endoteliálních buněk a tvorbu kapilár *in vitro*, zatímco inhibice exprese tyto účinky snižuje (Li Volti et al. 2005). Studie *in vivo* ukázala, že angiogenní mediátory jako je VEGF a SDF-1 (stromal cell derived factor 1) podporují expresi *HMOX1* a že lokální inhibice *HMOX1* blokuje angiogenezi (Deshane et al. 2007).

Role HO-1 v angiogenezi se ukazuje jako složitá. Nadměrná tvorba HO-1 je proangiogenní. Zvýšená aktivita HO-1 zlepšuje syntézu VEGF a endoteliální buňky nadměrně exprimující HO-1 vykazují zvýšenou angiogenní aktivitu. Podobně je účinek induktorů exprese HO-1 jako cytokiny nebo NO také proangiogenní. Nelze však vyloučit, že některé angiogenní účinky způsobené nehemovými induktory HO-1 jsou na HO-1 nezávislé. Snížení tvorby zánětlivých cytokinů, ovlivnění syntézy NO a oslabení produkce ROS dává HO-1 antiangiogenní funkci (Dulak et al. 2004).

3.3.6.9 Protizánětlivá role

Zánět je komplexní reakce imunitního systému v místech infekce, expozice toxinu nebo poškození buněk. Ačkoli je HO-1 exprimován ve všech buňkách a tkáních, zdá se, že protizánětlivé účinky HO-1 jsou kriticky závislé na jeho funkcích specifických pro buněčný typ (Paine et al. 2010).

Indukce HO-1 chrání před cytotoxicitou oxidačního stresu a apoptotickou buněčnou smrtí. Příznivé ochranné účinky HO-1 při zánětu jsou zprostředkovány nejen enzymatickou degradací prozánětlivého hemu, ale také produkcí protizánětlivých sloučenin bilirubinu a oxidu uhelnatého (Paine et al. 2010).

Myeloidní buňky zahrnují monocyty, makrofágy a dendritické buňky, které hrají zásadní regulační roli v přirozeném a adaptivním imunitním systému (Geissmann et al. 2010). Například makrofágy přijímají a ničí mikroorganismy a tvoří první linii obrany. Jsou aktivovány různými imunologickými stimuly, jako jsou mikrobiální produkty a cytokiny, aby

iniciovaly zánětlivé imunitní odpovědi (Zhang & Mosser 2008). U makrofágů hlodavců bylo prokázáno, že HO-1 je regulován lipopolysacharidem (LPS), který pak zeslabuje expresi různých prozánětlivých genů včetně cyklooxygenázy-2, indukovatelné syntázy oxidu dusnatého (iNOS), TNF nebo interleukinu (IL-6) (Kapturczak et al. 2004). Myši s myeloidní buněčně specifickou genetickou deficiencí HO-1 vykazovaly defekt dráhy interferonu spolu s patologickými imunitními odpověďmi u experimentálně vyvolaných infekcí a experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (Tzima et al. 2009).

HO-1 je také důležitý pro funkci dendritických buněk, které jsou hlavní buněčnou populací pro prezentaci antigenu a pro iniciaci adaptivních imunitních odpovědí. Konkrétně bylo prokázáno, že cílená regulace HO-1 moduluje maturaci a buněčně specifické funkce dendritických buněk v lidských a myších modelech (Park et al. 2010). Zdá se, že HO-1 má všestranné funkce prostřednictvím imunomodulace myeloidních buněk.

Endoteliální vrstvy jsou úzce spojeny se zánětem, protože představují bariéru mezi periferním proudem krve a zanícenými tkáněmi. Endotel reguluje nábor a migraci imunologicky aktivních krevních buněk, jako jsou polymorfonukleární leukocyty a T lymfocyty do místa zánětu (Cook-Mills & Deem 2005). Ukázalo se, že HO-1 přímo ovlivňuje buněčné interakce polymorfonukleárních leukocytů s endoteliálními buňkami na modelu potkanů *in vivo*, ve kterém zvýšená aktivita HO snížila adhezi těchto buněk během experimentálních oxidačních stresových podmínek. Nezávisle byly pozorovány hlavní patologické změny endotelu u knockoutovaných myší HO-1, u kterých byly endoteliální buňky náchylnější k apoptotické buněčné smrti a denudaci z extracelulární matrice (True et al., 2007). Nezávisle bylo prokázáno, že protizánětlivá endoteliální ochrana prostřednictvím HO-1 je zprostředkována pomocí její schopnosti snižovat expresi různých adhezních molekul indukovanou TNF (Soares et al. 2004). HO-1 tedy působí proti zánětlivým reakcím prostřednictvím modulace různých funkcí endoteliálních buněk.

Hem vykazuje protichůdné biologické funkce. Na jedné straně hraje fyziologickou roli při přenosu kyslíku a mitochondriálních elektronů jako základní prostetické skupiny hemoglobinu, myoglobinu a cytochromů (Mense & Zhang 2006). Na druhé straně je volný protein bez vazby na bílkoviny vysoce toxický, protože může způsobit oxidační stres. Vzhledem k prooxidačním vlastnostem volného hemu, které byly ukázány na různých modelech živočišných a buněčných kultur, je enzymatická syntéza a degradace této molekuly přísně kontrolována (Ryter & Tyrrell 2000). Nedávno bylo prokázáno, že volný hem má prozánětlivé vlastnosti. Ukázalo se například, že hem je odpovědný za zvýšený příliv leukocytů do orgánů během experimentálního zánětu *in vivo*. Lze si tedy představit, že enzymatická degradace volného hemu přes HO-1 hraje rozhodující roli pro protizánětlivé funkce HO-1 (Gozzelino et al. 2010).

Role BR jako prospěšné sloučeniny se silnými antioxidačními a protizánětlivými účinky byla objevena teprve v posledních letech (Kapitulnik & Maines 2009). Ochrana před experimentálním zánětem prostřednictvím biliverdinu odvozeného od HO-1 byla prokázána na zvířecích modelech prozánětlivých kardiovaskulárních poruch a gastrointestinálních poruch. Nezávisle se na ochraně před endoteliální aktivací a dysfunkcí v lidských endoteliálních aortálních buňkách podílejí prospěšné účinky BR (Paine et al. 2010).

Přestože je CO obecně považováno za toxický plyn, bylo také zjištěno, že má hlavní fyziologické funkce jako signální molekula. Konkrétně se ukázalo, že CO odvozený z HO-1 se

podílí na regulaci apoptózy, vazodilatace a zánětu. Podobně jako signalizační plyn NO, CO reguluje produkci cGMP a tento mechanismus se podílí na dalších funkcích CO, jako je vazodilatace a blokování proliferace buněk hladkého svalstva. Hlavní potenciál pro budoucí terapeutické aplikace mohou mít molekuly uvolňující CO (CORM), což jsou sloučeniny, které dodávají CO do svých cílových míst bez toxicity plynného CO (Motterlini et al. 2005). Souhrnně, HO-1 působí proti zánětlivým reakcím prostřednictvím metabolické přeměny prozánětlivého hemu a produkcí protizánětlivých sloučenin BR a CO.

Bylo provedeno velké množství studií k vymezení různých úloh HO-1 při zánětlivých, neurodegenerativních a jiných stresových stavech. Skutečná role HO-1 v různých stresech však dosud nebyla objasněna. Několik studií navrhlo prospěšné role HO-1 u lidí, např. chrání tkáň před různými stresy. Zatímco jiní uvedli, zapojení HO-1 do progresu onemocnění. Zdá se, že HO-1 ve snaze chránit buňky před stresem nedobrovolně vede k několika škodlivým stavům včetně neurodegenerativních chorob a rakoviny. Proto se indukce HO-1 v různých stresových podmínkách jeví jako nezbytné zlo. Existuje tedy potřeba hledat spojení mezi HO-1 a kandidátními geny (jako jsou onkogeny a tumor-supresorové geny u rakovin) zapojené do různých nemocí, aby se identifikovala skutečná role HO-1. To bude významné při odhalování vztahu mezi aktivací HO-1 a etiologií takových chorob. Dále to nakonec pomůže využít HO-1 jako potenciální terapeutický cíl pro zmírnění různých stresových onemocnění.

3.4 Metody pro analýzu exprese genů

Pro kvantifikaci mRNA z různých vzorků se používají různé metody. Tyto metody zahrnují in situ hybridizační techniky, testy na ochranu před RNázami, Northern blotting a qRT-PCR. Mnoho z těchto technik je stále používáno pro analýzu genové exprese v prokaryotickém i eukaryotickém systému. Teoreticky lze každou z výše uvedených technik použít ve spojení s jinými technikami a testy pro detekci specifických RNA a přesné stanovení hladin exprese. Northern blotting je jedinou metodou, která poskytne informace týkající se velikosti transkriptu a integrity vzorků RNA. Hybridizace in situ může být použita k lokalizaci exprese specifického genu v dané buňce, ale je nejsložitější ze všech metod. qRT-PCR umožňuje analýzu genové exprese na úrovni jedné buňky a může být provedena na velkém počtu vzorků a mnoha různých genech ve stejném experimentu (Sharkey et al. 2004).

Protože qRT-PCR nabízí nejcitlivější a nejflexibilnější metodu pro detekci exprese jednotlivých nebo více genů, je stále více spojována s různými jinými strategiemi pro absolutní kvantifikaci. V kompetitivní RT-PCR (cRT-PCR) jsou známá množství vnitřního standardu koamplifikována ve stejné reakční zkumavce se sledovanou sekvencí, což umožňuje stanovit úroveň exprese zkoumaného genu (genů) (Freeman et al. 1999).

3.4.1 Test rezistence k RNáze (RPA)

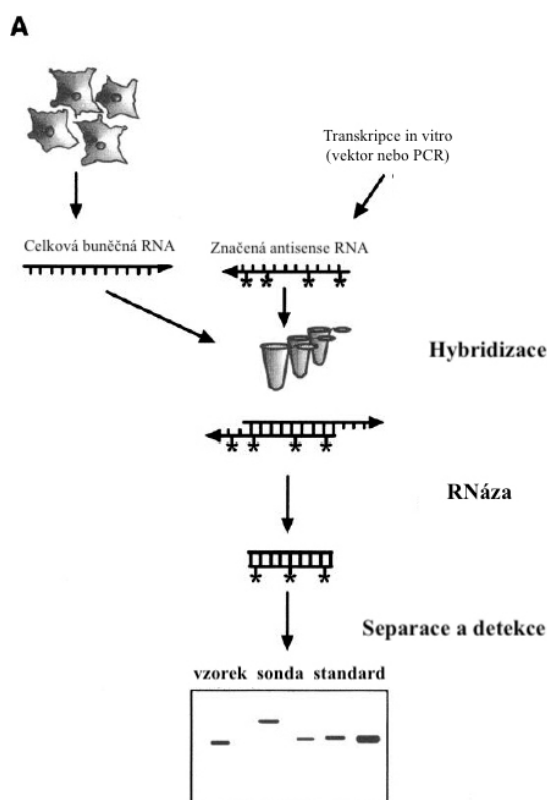
Test rezistence k RNáze je citlivou metodou, která lokalizuje specifickou molekulu RNA ve směsi izolované z biologického materiálu (viz Obr. 23) (Qu & Boutjdir 2007).

Začíná přípravou značené sondy. RNA sonda je syntetizována bakteriofágovou RNA polymerázou (SP6, T7, T3), která iniciuje transkripci ze specifických fágových promotorů, které byly zkonstruovány do řady běžných plazmidových vektorů. Vzniká tak komplementární

RNA sonda k vyizolované mRNA. Radioaktivně značená sonda nasedá na mRNA vyizolovanou z požadovaných buněk, přičemž hybridizační reakce probíhá několik hodin.

K hybridizační reakci je poté přidána RNáza. Tato nukleáza štěpí jednovláknové nescifické molekuly mRNA, ale hybridy RNA-RNA jsou rezistentní vůči štěpení. Velikost rezistentního fragmentu může být stanovena elektroforézou na denaturujícím polyakrylamidovém gelu s vysokým rozlišením (Carey et al. 2013).

Hlavní výhodou RPA je vysoká citlivost a současná detekce a kvantifikace více cílových mRNA v jediném vzorku. Primárním omezením této metody je nedostatek informací o velikosti přepisu, který závisí na velikosti sondy. Metoda se podobá Northern blottingu, ale příprava sond je mnohem pracnější. I přes nevýhody se metoda stále používá ke studiu exprese genů (Qu & Boutjdir 2007).



Obrázek 23 Schéma RPA (Qu & Boutjdir, 2007)

3.4.2 In situ hybridizace

In situ hybridizace (ISH) je technika, která umožňuje přesnou lokalizaci specifického segmentu nukleové kyseliny v morfologicky konzervovaných chromozomech, buňkách nebo histologických řezech. Základem ISH je to, že nukleové kyseliny, pokud jsou dostatečně konzervovány v histologickém vzorku, mohou být detekovány aplikací komplementárního řetězce nukleové kyseliny, ke které je připojena reportérová molekula (sonda). Vizualizace reportérové molekuly umožňuje lokalizovat DNA nebo RNA sekvence v heterogenních buněčných populacích (Lee et al. 2013).

Optimalizace tkáňového zpracování, včetně fixace a skladování je důležitá pro detekci intracelulárních nukleových kyselin. Musí se zachovat DNA/RNA a tkáňová morfologie. Pro hybridizaci se používá mnoho různých typů sond. Při výběru sondy je důležité vzít v úvahu citlivost, specifitu, jak snadno sonda proniká do tkáně, aplikace a reprodukovatelnost metody.

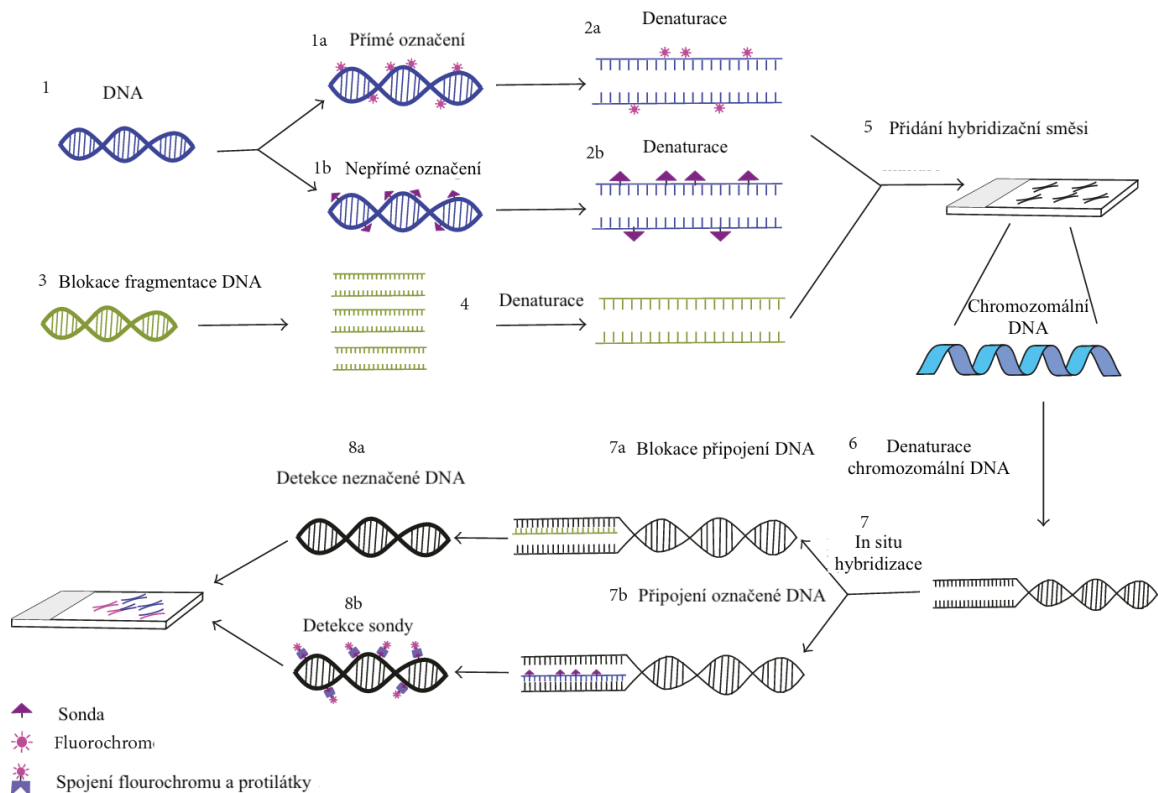
Sondy, které lze použít zahrnují dvouvláknové DNA sondy, jednovláknové antisense RNA sondy (robiprobly), jednořetězcové DNA sondy generované polymerázovou řetězovou reakcí, syntetické oligodeoxynukleotidové sondy a oligoribo sondy (Jensen 2014).

Hybridizační sondy mohou být označeny dvěma způsoby. Radioaktivními izotopy (^{32}P , ^{35}S , ^3H) nebo neradioaktivními látkami (biotin, digoxigenin, fluorescenční barva). Výhodou radioaktivně značených sond je jejich schopnost detekovat ve velmi malém množství transkriptů. Mají však také některá hlavní omezení, jako velmi dlouhé doby expozice a relativně špatné rozlišení v závislosti na použitém radioizotopu. Neradioaktivně značené sondy výrazně zlepšily metodu ISH zkrácením doby a vynikajícím histologickým rozlišením (Morris et al. 1990).

Hlavní výhodou hybridizace in situ je to, že umožňuje maximální využití tkáně, kterou je obtížné získat (např. embryí, tkáně z klinické biopsie). Na stejné tkáni lze provádět stovky různých hybridizací. Nevýhodou použití je obtížnost identifikace cílů, které mají nízké kopie DNA a RNA. Stále se však vyvíjejí přístupy ke zlepšení citlivosti. Např. amplifikace cílových sekvencí nukleových kyselin před hybridizací in situ, nebo detekcí signálu po dokončení hybridizace (Qian & Llyod 2003). Mezi nejznámější typ in situ hybridizace je fluorescenční in situ hybridizace (FISH), která se původně používala pro klasifikaci chromozomů, ale dnes je používána při mapování chromozomálních genů, charakterizaci a identifikaci genetických abnormalit souvisejících s genetickým onemocněním nebo neoplazmatickými poruchami a detekce virových genomů (Jensen 2014).

Metody in situ hybridizace jsou v současné době důležitým nástrojem ve vědeckém výzkumu a v klinickém prostředí. Informace získané těmito metodami výrazně přispěly vědcům v různých oblastech výzkumu, jako jsou virové infekce, genové mapování, cytogenetika, genová exprese a prenatální diagnostika a vývoj.

Schéma in situ hybridizace je zobrazeno na následujícím obrázku číslo 24.



Obrázek 24 Schéma in situ hybridizace (Ramzan et al., 2017)

3.4.3 Northern blotting

Hybridizace nukleových kyselin je proces, ve kterém dvě DNA nebo RNA (jednořetězcové) z různých biologických zdrojů vytvářejí dvojité řetězce, který je založený na sekvenční homologii těchto dvou zdrojů. Vznikají DNA-DNA, RNA-RNA nebo DNA-RNA hybridy. Účelem je identifikace nebo lokalizace určitých sekvencí nukleových kyselin (genů) v genomu některých druhů. Cílová molekula DNA, RNA nebo protein je identifikována nebo lokalizována molekulou sondy. Ta identifikuje cíl komplementární hybridizací. Hybridizace na pevném nosiči je: Southern blotting, Northern blotting a Western blotting. Metody mají několik fází. Syntéza sondy, značení sondy (radioaktivně nebo neradioaktivně), zpracování cílové DNA, denaturace cílové DNA, přenos cílové DNA na pevný nosič a molekulární hybridizace (Brown 2007).

Blotovací metody jsou doplňkem gelové elektroforézy. Umožňují detekci specifických molekul ve směsi separované v gelu. Metody mají společný krok, ve kterém jsou molekuly přeneseny z gelu na porézní membránu (Southern 2006).

U DNA a RNA jsou specifické sekvence detekovány v membráně molekulární hybridizací značenými sondami nukleových kyselin. DNA sondy se nyní používají častěji než RNA. Nylonové membrány nahradily nitrocelulózu a přenos se provádí spíše v alkalickém prostředí, aby se zabránilo opětovné asociaci sekvencí DNA během přenosu (Southern 2006). Hlavní výhoda nylonových membrán spočívá v tom, že jsou relativně robustní, a proto mohou být desetkrát nebo vícekrát znovu hybridizovány se sondou, než se rozpadnou. Nitrocelulózkové membrány jsou křehké a lze je jen zřídka použít více než třikrát (Brown 2007).

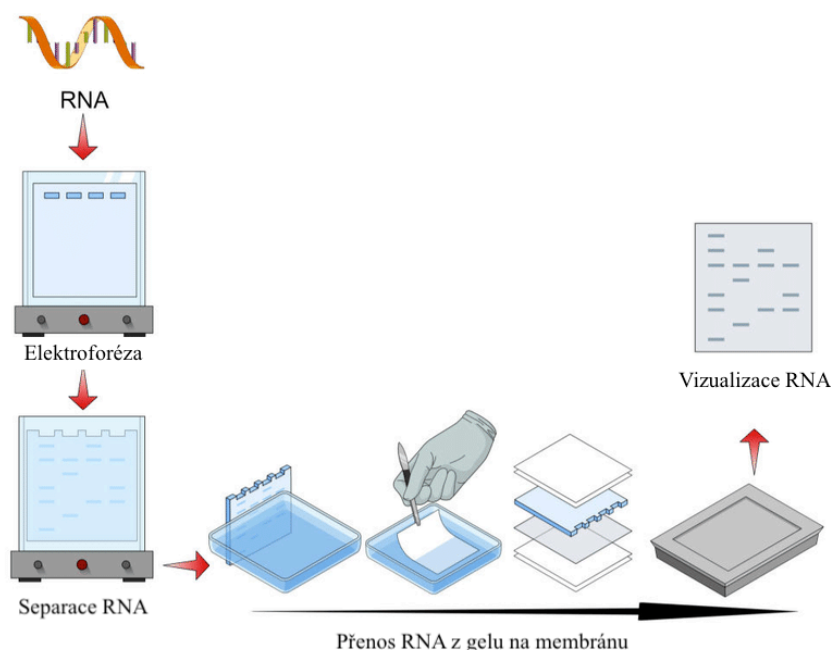
Southern blotting je přenos DNA fragmentů z elektroforézního gelu na membránový nosič, což má za následek imobilizaci těchto fragmentů DNA, takže membrána nese semipermanentní reprodukci pruhového vzoru gelu. Po imobilizaci může být DNA podrobena hybridizační analýze, což umožňuje identifikaci pásů se sekvenční podobností se značenou sondou (Brown 2007).

Analýza Northern blotting je metoda získávání informací o velikosti a množství specifické RNA v komplexní směsi. Stručný postup obsahuje tyto kroky. Vzorek RNA (např. RNA z celých buněk nebo její část) se frakcionuje podle velikosti gelovou elektroforézou. Potom je RNA přenesena na membránu (blotována) a analyzována vazbou (hybridizací) s jednou nebo více značenými sondami specifických pro danou RNA (viz Obr. 25) (Josefsen & Nielsen 2011).

Northern blotting poskytuje informaci o délce molekuly RNA a možné existenci variant délky, protože je RNA elektroforezována za denaturačních podmínek paralelně s markerem molekulové hmotnosti (RNA žebřík) (Shan 2013).

Northern blotting je často používán jednoduše k prokázání přítomnosti specifické RNA ve vzorku, ale metoda také umožňuje kvantitativní měření. Měří se úroveň ustáleného stavu RNA. Pokud se Northern blotting používá jako kvantitativní metoda, je obvykle postavena na porovnání hladiny RNA v různých experimentálních situacích spíše než pro stanovení absolutních množství (Josefsen & Nielsen 2011).

Blotovací metody byly nahrazeny Sangerovým sekvenováním, které poskytuje více informací, nebo metod založených na polymerázové řetězové reakci (PCR), která je jednodušší provést. Blotování se stále používá v řadě aplikací, jako je měření počtu kopií transgenů nebo k analýze příliš dlouhých úseků DNA. Používá se také ve studiích struktury DNA (Southern 2006).



Obrázek 25 Schéma Northern blottingu (Hamad et al., 2017)

3.4.4 PCR

Nástup polymerázové řetězové reakce (PCR) radikálně transformoval biologickou vědu od doby, kdy byl poprvé objevena (Mullis 1990). Poprvé to umožnilo specifickou detekci a produkci velkého množství DNA. Strategie založené na PCR vedly k obrovským vědeckým snahám jako je Human Genome Project.

Tato technika je v současné době široce používána klinickými lékaři a výzkumníky k diagnostice nemocí, klonování a sekvenování genů a k provádění sofistikovaných kvantitativních a genomických studií rychlým a velmi citlivým způsobem. Jednou z nejdůležitějších lékařských aplikací klasické metody PCR je detekce patogenů. Kromě toho se používá ve forenzním lékařství (Waters & Shapter 2014).

Vzhledem k rozsáhlému použití je důležité porozumět základním principům PCR a jak lze její použití upravit tak, aby umožňovalo sofistikovanou analýzu genů a genomu (Garibyan a Avashia 2013).

3.4.4.1 Historie

Když byla polymerázová řetězová reakce popsána v polovině 80. let (Mullis et al. 1986, Mullis & Faloona 1987), lidé si začali představovat, že ji použijí jako nástroj pro kvantifikaci malých počtů molekul nukleových kyselin. Než bylo možné provést kvantitativní PCR, muselo se překonat mnoho problémů: starší techniky se musely vylepšovat a nové vynalézt.

Prvním velkým průlomem byla změna labilního Klenowova fragmentu *Escherichia coli*, který musel být přidán v každém cyklu tepelně stabilní polymerázou (Taq) dříve izolované z *Thermus aquaticus*. Ta od té doby tvořila základ PCR (Saiki et al. 1988).

Další studie ukázaly, že jsou možné jak relativní, tak absolutní kvantifikace. Ve Spojených státech byl prvním komerčně dostupným kvantitativním testem detekce nukleových kyselin založeným na PCR testu Roche Amplicor HIV-1 Monitor, verze 1.0, který byl schválen Food and Drug Administration (FDA) v roce 1996 (Crescenzi et al. 1988).

Do roku 2009 byly vyřešeny nejvýznamnější technické problémy. Techniky se staly dostatečně automatizovanými a robustními, aby se rutinní, komerčně dostupné laboratorní testy, mohly denně provádět ve velkých klinických laboratořích. Asi největším krokem k tomu, aby bylo kvantitativní PCR obecně proveditelné, byl vývoj rapid-cycle PCR koncem 80. let provedený Wittwerovou skupinou na univerzitě v Utahu (Wittwer & Garling 1991).

Dlouho před tím, než byla vyvinuta kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR), bylo podniknuto mnoho dalších kroků s konvenční PCR.

3.4.4.2 Optimalizace

Optimalizace procesu PCR je hlavním faktorem při dosahování vysoké účinnosti, což vede k úspěšné kvantifikaci cílových sekvencí nukleových kyselin. Zahrnuje mnoho faktorů, včetně výběru cílové oblasti, vazebných míst primerů v této oblasti, postup extrakce nukleových kyselin, koncentrace divalentních kationtů, cyklických teplot a dob trvání. V real-time PCR navíc typ detektorové sondy a vazebná místa (Elnifro et al. 2000).

Je důležité minimalizovat čas různých teplot, aby nedocházelo k nesprávné interpretaci a falešnému zahájení transkripce (viz Hot starts). Je důležité vybrat jedinečné cílové místo

(nejlépe takové, které je vysoce konzervované, protože mutace mohou být problematické) a jedinečné vazebné místo primeru a sondy. To není jednoduché, protože genové rodiny a pseudogeny mohou zmást cíl výběru. Cíl by neměl tvořit terciální struktury, které by mohly interferovat s amplifikací. Primery a sondy, pokud jsou přítomny v reakční směsi, se nesmí vázat k sobě navzájem nebo k nežádoucím cílům. Obsah G:C v cíli musí umožňovat disociaci při rozumných teplotách. Dnes existují katalogy sekvencí a počítačové algoritmy, které umožňují vyhledávání nejvhodnějších míst (Walsh et al. 1992).

Při optimalizaci reakce je třeba vzít v úvahu další faktory. Je-li cíl relativně krátký, může se zesílit amplifikace cíle, protože je jen málo míst jiných než cíl, poskytujících vazebné příležitosti pro oba páry primerů. I ve vysoce konzervovaných oblastech genomů se mohou objevit mutace.

3.4.4.3 Hot starts

V nepřítomnosti inhibitorů a při nejlepší optimalizaci se stále nemusí tvořit kopie zamýšleného cíle. Může to být způsobeno teplotami, které jsou pod optimem pro perfektní vazbu primeru na cíl. Produkty chybně nasedlých primerů nebo dimery primerů mohou převyšovat skutečné kopie zamýšleného cíle, pokud byl původní počet cílů nízký. Dimery primerů, které jsou velmi krátké, se aplikují s velkou účinností, jakmile se vytvoří, ačkoli to je zdánlivě v rozporu s teorií PCR (Lebedev et al. 2008).

Zjistilo se, že zadržením základní složky reakční směsi až do dosažení optimální teploty minimalizuje účinky vytváření chybného produktu. Brzy bylo zjištěno, že pokud byl použit vosk na místo parafinového oleje k zabránění odpařování reakční směsi, dalo by se některé reaktanty umístit nad vosk a ty by se smíchaly, až když by se teplota zvýšila nad bod tání vosku. Horký start (hot start) pomocí parafinového vosku tak zlepšil výsledek reakce. Stal se rychle novým standardem. Nebyl však uživatelsky přívětivý a hledaly se alternativy, které by umožňovaly nastavit reakce při pokojové teplotě bez vícenásobných otvorů zkumavky nebo bez použití vosků (Mullis 1991).

Přístup pomocí neutralizační protilátky byl velmi úspěšný. Monoklonální protilátky (mab) proti *Taq* polymeráze inhibovaly aktivitu enzymu. Když byla teplota reakční směsi zvýšena, byla protilátka denaturována, což umožnilo aktivaci polymerázy (Sharkey et al. 1994).

Modifikované enzymy DNA polymerázy byly izolované z jiných organismů nebo geneticky upraveny ze sekvence polymerázy *Thermus aquaticus* (Lawyer et al. 1993). Dnes existuje mnoho termostabilních polymeráz například *Taq* Gold, která je geneticky upravená a stává se aktivní pouze při teplotách nad 70 °C, nebo *Tth* polymeráza odvozena od *Thermus thermophilus*, která má podobný teplotní profil a také může vytvořit řetězec DNA komplementární k RNA pomocí primerů PCR (Lebedev et al. 2008).

Stále se vyvíjejí nové varianty technik hot starts. Příkladem jsou teplem aktivované primery (Lebedev et al. 2008).

3.4.4.4 Kontaminace

V PCR existují dva aspekty kontaminace: kontaminace vzorků a kontaminace aplikonů (Wayne et al. 2009).

Uspořádání laboratoře pro PCR se samostatnými místnostmi pro přípravu, pro amplifikaci a pro detekci bylo popsáno v řadě článků. Používání rukavic a ochranných oděvů, manipulace se vzorky, svědomitá pozornost k technice, pipetování, časté čištění laboratoře a snížení kontaminace pomocí ultrafialového záření jsou všechno kroky, které se staly přirozené těm, kteří pracují v molekulárních laboratořích (Wayne et al. 2009).

Významnějším zdrojem je amplikonová kontaminace. Například konvenční reakční zkumavka PCR obvykle obsahuje 1012 kopií primerů v objemu 100 μL . Teoreticky by tedy mohlo být 1012 amplikonů na konci reakce s vysokým počátečním počtem cílů. 0,1 μL , neviditelná kapička aerosolu by mohla obsahovat 109 amplikonů. Kromě toho lze tyto amplikony přenášet z rukavic, klávesnic přístrojů, stolních desek, spínačů světla, kliky dveří chladničky a mrazáku, telefonních tlačítek, stojanů na zkumavky a kdekoli jinde v laboratoři (Garibyan & Avashia 2013).

Když se používá real-time PCR, musí být kontaminace vzorků vyloučena. Při ručních extrakcích je nutné otvírat pouze jeden vzorek. Pro monitorování kontaminace je často žádoucí mít negativní kontrolní zkumavky, které obsahují vše kromě nukleové kyseliny, která má být amplifikována. Některé by měly zůstat otevřené během všech kroků, aby se zjistila kontaminace ve vzduchu, zatímco jiné by se měly okamžitě naplnit a uzavřít, aby se zjistila kontaminace činidel (Wayne et al. 2009).

Kromě toho může být do testů zařazen způsob inaktivace amplikonů. Standardní metoda zahrnuje použití uracil-N-glykosidázy. Pro použití uracil-N-glykosidázy se v reakční směsi místo dTTP používá glykosylovaný dUTP. Ten je začleněn do amplikonu namísto dT. Pokud nějaké amplikony vstoupí do jiné reakce, liší se od autentického cíle. Enzym uracil-N-glykosidáza je součástí reakční směsi. Odštěpí glykosylovaný dU od všech kontaminujících amplikonů, což způsobí jejich štěpení. Je zřejmé, že je důležité, aby uracil-N-glykosidáza nevykazovala žádnou aktivitu vůči nativnímu cíli a k dosažení toho je nutná určitá modifikace reakčních parametrů (Waters & Shapter 2014).

3.4.4.5 Průběh PCR

PCR je jednoduchý, ale elegantní enzymatický test, který umožňuje amplifikaci specifického fragmentu DNA z komplexního souboru DNA. Dr. Kary Mullis, který objevil test PCR, uvedl, že „vám umožní vybrat část DNA, o kterou máte zájem, a mít ji tolik, kolik chcete“ (Mullis 1990).

PCR může být prováděna za použití templátové DNA z různých tkání a organismů, včetně periferní krve, kůže, vlasů, slin a mikrobů. K vytvoření dostatečného množství kopií pro analýzu pomocí konvenčních laboratorních metod je zapotřebí pouze stopových množství DNA. Z tohoto důvodu je PCR citlivý test (Garibyan & Avashia 2013).

Každý test PCR vyžaduje přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů a DNA polymerázy. DNA polymeráza je klíčovým enzymem, který spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku produktu PCR. Nukleotidy zahrnují čtyři báze-adenin, thymin, cytosin a guanin (A, T, C, G), které se nacházejí v DNA. Působí jako stavební kameny, které používá DNA polymeráza k vytvoření výsledného produktu PCR (Garibyan & Avashia 2013).

Primery v reakci specifikují přesný produkt DNA, který má být amplifikován. Primery jsou krátké fragmenty DNA s definovanou sekvencí komplementární k cílové DNA, která má

být detekována a amplifikována. Slouží jako prodloužení pro navázání DNA polymerázy (Chou et al. 1992).

Výše uvedené složky jsou smíchány ve zkumavce nebo 96 jamkové destičce a poté umístěny do stroje, který umožňuje opakované cykly amplifikace DNA ve třech základních krocích. Stroj je v podstatě tepelný cyklovač. Má tepelný blok s otvory, do kterého jsou vloženy zkumavky nebo destičky nesoucí reakční směs PCR. Stroj zvyšuje a snižuje teplotu bloku přesnými a předprogramovanými kroky (Weier & Gray 1988).

Reakční roztok se nejprve zahřeje nad teplotu tání dvou komplementárních řetězců cílové DNA, což umožňuje separaci řetězců nazývanou denaturace. Teplota se potom sníží, aby se specifické primery mohly vázat na cílové segmenty DNA, což je proces známý jako hybridizace nebo annealing. Teplota se opět zvýší a je DNA polymeráza je schopna prodloužit primery přidáním nukleotidů do vyvíjejícího se řetězce DNA – elongace. S každým opakováním těchto tří kroků se počet zkopírovaných molekul DNA zdvojnásobí (Garibyan & Avashia 2013).

3.4.4.6 Analýza PCR produktu

Schémata včasné detekce zahrnovala Northern a Southern blotting. Tyto metody však byly necitlivé a další podobné techniky odvozené (tečkový či štěrbinový blotting) byly nepraktické při analýze mnoha vzorků (Wayne et al. 2009).

Další varianta zahrnovala inkorporaci radioaktivně značených (obvykle $^{32}\text{PO}_4$) nukleotidů do amplikonů. Produkt PCR byl podroben elektroforéze na agarózovém gelu. Gel byl sušen na kusu filtračního papíru a umístěn na vrstvu rentgenového filmu (s nebo bez zesilovače) po dobu, která mohla být měněna, aby se získala optimální expozice filmu. Potom bylo množství amplifikovaného produktu stanoveno denzitometrií. Použití radioaktivity zjevně zahrnovalo monitorování, bezpečnost a problémy s likvidací. Proto byly žádoucí jiné techniky (Wayne et al. 2009).

Jedna z nejpoužívanějších z nich, i když mnohem méně citlivá, je vizualizace pomocí ethidiumbromidu (EtBr), který se váže do dvouřetězcových nukleových kyselin a stává se fluorescenčním. Po elektroforéze je dvouvláknový DNA produkt detekován na gelu. Gel byl umístěn na ultrafialové světlo, které způsobuje fluorescenci DNA obsahující EtBr. Byla provedena denzitometrie, aby se stanovilo množství navázaného ethidiumbromidu a množství přítomného produktu DNA. Obě tyto techniky byly obtížnější, pokud se jednalo o molekuly několika různých velikostí. Množství inkorporovaného $^{32}\text{PO}_4$ nebo interkalované množství EtBr byly úměrné délce molekuly DNA. Aby to na gelu mohlo být rozlišitelné, musely mít amplikony různé délky nebo musely obsahovat místo přístupné ke štěpení restrikcními endonukleázami, aby se vytvořily různé délky. Technika EtBr byla přiměřeně rychlá, ale úspěšná byla pouze pokud byla vysoká koncentrace amplikonů (Sigmon & Larcom 1996).

Jiní pracovníci vyvinuli sondy značené širokou paletou fluorogenních molekul. Byly stále populárnější, a to i při standardní PCR. Jejich citlivost se přiblížila citlivosti radioaktivního značení. Žádná z těchto technik však nebyla rychlá. Čas potřebný k detekci po dokončení PCR reakce se pohyboval od hodin do dnů. Průlom, který vedl ke kvantitativní real-time PCR byly hlavně přístroje a sondy. Detekční sondy budou popsány v části real-time PCR (Wayne et al. 2009).

Bylo vyvinuto mnoho technik nazývaných „molekulární sendvič“, které lze kvantifikovat. Jedním z nich je mít sondu zachycenou v jamkách multijamkové destičky. Po dokončení PCR reakcí se reakční směs přidá do jamky, zahřeje se a pomalu ochladí, aby cílová sekvence hybridizovala se záchytnou sondou. Detekce může být provedena několika způsoby v závislosti na konstrukci systému. Pokud má primer na 5'konci biotin, lze přidat avidin spojený s enzymem. Komplex avidin-enzym se váže na biotinylovaný amplikon. Po promytí se dále přidá bezbarvý substrát, který poskytuje barevný produkt a množství vyvinuté barvy je úměrné množství vázaného amplifikačního produktu, které je, alespoň teoreticky, přímo spojeno s počátečním množstvím přítomného cíle (Wayne et al. 2009).

Jiná verze této techniky zahrnuje připojení biotinu k 5'konci jednoho z amplifikačních primerů. Po dokončení reakce PCR se reakce zahřeje, aby se vlákna rozdělila a jedno vlákno s biotinylovaným primerem se naváže na avidinem potaženou jamku. Sonda s enzymem se pak hybridizuje s navázaným produktem PCR. Detekce zahrnuje přeměnu bezbarvého substrátu na barevný produkt. Vývoj těchto technik popsal Landgraf et al. 1991 a Lundeberg et al. 1991.

V dnešní době existují dva hlavní způsoby vizualizace produktů PCR: (i) barvení amplifikovaného produktu DNA chemickým barvivem, jako je ethidium bromid, který se interkaluje do šroubovice DNA, nebo (ii) značení PCR primerů nebo nukleotidů fluorescenčním barvivem (fluorofory) před PCR amplifikací (Stephenson 2016).

Používanou metodou pro analýzu produktu PCR je použití elektroforézy na agarózovém gelu, která odděluje produkty DNA na základě velikosti a náboje. Elektroforéza na agarózovém gelu je nejjednodušší metodou vizualizace a analýzy produktu PCR. Umožňuje stanovení přítomnosti a velikosti produktu PCR. Předem stanovená sada produktů DNA se známými velikostmi se na gel přidává současně jako standardizované molekulární markery, které pomáhají určit velikost produktu (ladder) (Stephenson 2016).

Dnes se typicky PCR používá k detekci přítomnosti nebo nepřítomnosti specifického produktu DNA a nazývá se kvalitativní PCR. Kvalitativní PCR je dobrá technika, která se používá, když se provádí PCR klonování nebo identifikace patogenu (Waters & Shapter 2014).

3.4.4.7 Výhody a omezení PCR

PCR má několik výhod. Zprv je to jednoduchá technika pro pochopení a použití a rychle přináší výsledky (Bologna et al. 2008). Jedná se o vysoce citlivou techniku s potenciálem vytvořit miliony až miliardy kopií konkrétního produktu pro sekvenování, klonování a analýzu. To platí také pro qRT-PCR, ale qRT-PCR má výhodu kvantifikace syntetizovaného produktu. Lze jej tedy použít k analýze změn úrovně genové exprese v nádorech, mikrobech nebo jiných chorobných stavech (Stephenson 2016).

Ačkoli je PCR cennou technikou, má svá omezení. Protože PCR je vysoce citlivá technika, může jakákoli forma kontaminace vzorku dokonce stopovým množstvím DNA vést k zavádějícím výsledkům (Bologna et al. 2008, Smith & Osborn 2009). Kromě toho, aby bylo možné navrhnout primery pro PCR, jsou zapotřebí některá předchozí sekvenční data. Proto lze PCR použít pouze k identifikaci přítomnosti nebo nepřítomnosti známého patogenu nebo genu. Dalším omezením je, že primery použité pro PCR mohou tvořit nespecifické sekvence, které jsou podobné, ale ne zcela identické s cílovou DNA. Kromě toho mohou být DNA polymerázou inkorporovány nesprávné nukleotidy do PCR sekvence (Stephenson 2016).

3.4.5 qRT-PCR

Od svého zavedení našla polymerázová řetězová reakce (PCR) široké využití v široké škále aplikací, včetně klonování genů, mapování genů, detekce mutací, sekvenování DNA a lidské identifikace. PCR je také cenným nástrojem pro měření genové exprese. Inovace jak v přístrojové technice, tak ve fluorescenční chemii barviv, urychlily rychlý vývoj metod, které by mohly detekovat produkty PCR, jak jsou vyráběny v reálném čase (real-time) (Stephenson 2016).

Po několik let byla dnešní qRT-PCR nazývána rapid-cycle PCR (s rychlým cyklem). Rapid-cycle PCR a rapid-cycle reverse-transkriptase PCR byla vyvinuta skupinou lidí na Univerzitě v Utahu (Wittwer & Garling 1991). Použili 1-10 μ l reakčních objemů v uzavřených kapilárních zkumavkách a cykleru, který měnil teploty rychle proudícím vzduchem. To umožnilo dobu cyklu kratší než 30 sekund (v PCR stroji s kovovým topným blokem 3-5 minut). To zkrátilo dobu 30 cyklické reakce na 20-30 minut z 2,5 až 3 hodin, které vyžaduje standardní PCR. Provedení reakce v kapilární zkumavce umožnilo mnohem dostupnější monitorování emisemi světla. Část qRT-PCR byla popsána Higuchim et al. (1993) v Roche Molecular Systems. Jako detektor použili EtBr a monitorovali nárůst fluorescence v každém amplifikačním cyklu pomocí videokamery. V dnešní době je dostupných mnoho nástrojů a detekčních schémat (Stephenson 2016).

qRT-PCR snížila problémy s kontaminací, protože k detekci dochází současně při amplifikaci bez toho, aniž by došlo k otevření zkumavky. Přidáním plně automatizovaných systémů se rovněž snižují problémy s kontaminací a inhibicí. Nyní je možné získat výsledky PCR během několika hodin po odběru vzorku s nízkým rizikem kontaminace. Všechny real-time detekční testy používají detekční molekulu, která fluoreskuje při definované vlnové délce, pouze pokud je vázána na produkt amplifikace. Přístroje real-time PCR jsou navrženy tak, aby u každé reakční zkumavky bylo stanoveno množství produkované fluorescence na konci každého cyklu (Stephenson 2016).

Bylo popsáno mnoho metod qRT-PCR, ale dvě z nich se staly nejčastěji používané.

Jedna používá molekulu vázající DNA zvanou SYBR Green. Je to barvivo, které se váže na dvouvláknovou DNA, ale ne na jednovláknovou DNA, a pokud je takto vázán, fluoreskuje. Během cyklické reakce vzorek vytvoří rostoucí množství fluorescenčního signálu, protože se generuje stále více dvouřetězcových produktů, ke kterým se může zelené barvivo SYBR připojit. Množství fluorescence v reakci v jakémkoli konkrétním čase tedy přímo souvisí s počtem dvouřetězcových molekul DNA přítomných v reakci. Nevýhodou zelené SYBR je však to, že se bude vázat a fluoreskuje všechny dvouřetězcové produkty v reakci, ať už se jedná o specifické produkty, nespecifické produkty, dimery primerů nebo jiné amplifikační artefakty (Tajadini et al. 2014).

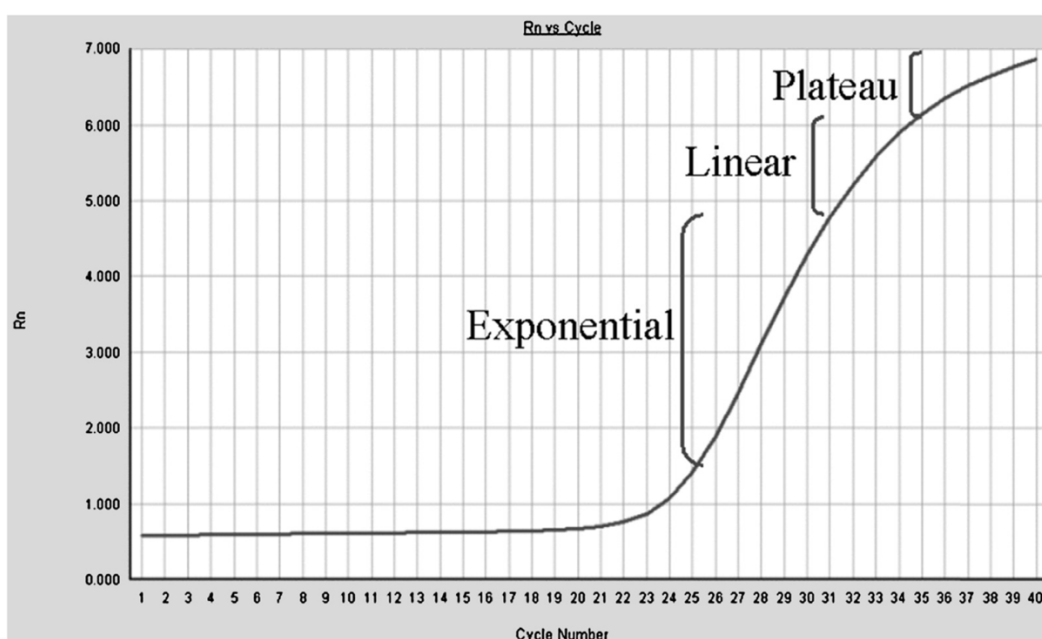
Další metoda qRT-PCR je známá jako test TaqMan. Používá sondu značenou barvivem, která nasedá na jeden z templátových vláken blízko za jedním ze dvou primerů PCR. Fluorescenční barvivo označované jako reportér, je připojeno na konci sondy. Na dalším konci sondy je další molekula, nazývaná zhášec, která absorbuje energii ze zdroje světla použitého k excitaci reportérového barviva. Nicméně během PCR Taq DNA polymeráza, která prodlužuje primer na cílovém řetězci sondy, vytěsňuje a degraduje anelovanou sondu působením její 5'-3' exonukleázové aktivity. Reportérové barvivo je tím uvolněno ze svého molekulárního

připojení k žhášeci a fluoreskuje. Čím více produktů PCR bylo generováno, tím více sond se může na tento produkt vázat. Čím více se sonda vázala, tím více reportérového barviva se uvolnilo během amplifikačního procesu a tím více se generoval signál. Fluorescenční signál tedy přímo souvisí s množstvím vstupního templátu (Tajadini et al. 2014).

Ať už se používají sondy SYBR Green nebo TaqMan, vztah mezi intenzitou signálu a množstvím templátu v RT-PCR reakci poskytuje spolehlivé prostředky, jak kvantifikovat nukleové kyseliny a testovat přítomnost nebo nepřítomnost specifických genových sekvencí.

3.4.5.1 Fáze real-time PCR

V qRT-PCR je cílová DNA sekvence amplifikována exponenciálně. Jeden templát je replikován na dva produkty, dva na čtyři, čtyři na osm atd. Exponenciální amplifikaci však nelze udržet navždy. Obvykle v 35. cyklu (ale v závislosti i na jiných faktorech) reakce zpomalí své tempo. Primery a dNTP již nejsou v nadbytku, DNA polymeráza ztratila stupeň své aktivity, nedochází už k úplné denaturaci a produkty jsou štěpeny nukleázovou aktivitou polymerázy. Jakmile dojde k těmto událostem, reakce vstoupí do lineární fáze, kde už nedochází ke zdvojnásobení templátu. Nakonec v určitém cyklu, reakce vstupuje do tzv. plató fáze, kde byla amplifikace ukončena (viz Obr. 26) (Wong & Medrano 2005).



Obrázek 26 Výsledný graf qRT-PCR (Wong & Medrano 2005)

qRT-PCR se spoléhá na schopnost přístroje detekovat cyklus amplifikace, kde se nahromadilo dost PCR produktu schopného generovat signál nad fluorescenčním šumem na pozadí signálu a na hranici detekce nástroje, která kolísá během časných cyklů amplifikace. Číslo cyklu qRT-PCR, na kterém lze oddělit signál od šumu v pozadí, se označuje jako prahová hodnota cyklu, nebo ve zkratce, hodnota C_T . V PCR se předpokládá, že všechny děje jsou si rovné (žádná inhibice nebo anomálie). Čím větší je množství vstupní nukleové kyseliny použité jako výchozí templát, tím větší je množství produktu, který lze vytvořit, a tím dříve může být detekován (Wayne et al. 2009).

S real-time PCR je to tak, že: čím větší je množství počátečního templátu, tím dříve je dosaženo prahové hodnoty cyklu, a tím je hodnota C_T nižší. To tvoří základ kvantifikace DNA.

Pro při 100% efektivní qRT-PCR by se měl produkt každý cyklus zdvojnásobit. Podobně změna hodnoty C_T o jedna představuje zdvojnásobení cílové molekuly. Změna C_T o dva představuje čtyřnásobné zvýšení množství produktu. Změna C_T o tři představuje osminásobné zvýšení amplifikovaného cíle atd. Matematicky lze změnu C_T (ΔC_T) vyjádřit jako $2^{-\Delta C_T}$. Hodnota C_T je automaticky určena softwarem nástroje real-time PCR, ale může být také nastavena ručně, přičemž se určuje prahová linie. Mezní hodnota, ať už je stanovena automaticky nebo ručně, definuje hodnotu C_T podle toho, kde protíná amplifikační křivku. Prahový cyklus by měl být určen v takové exponenciální oblasti amplifikační křivky, kde jsou složky reakce v hojném, neomezeném množství (Wayne et al. 2009).

3.4.5.2 Možnosti kontroly

Typický qRT-PCR experiment může zahrnovat několik kontrol.

NTC= netemplátová kontrola je reakce, která nese všechna činidla, primery a sondy nezbytné pro reakci real-time PCR, s výjimkou templátové DNA. NTC se používá ke zjištění, zda může být signál generován v nepřítomnosti cílové nukleové kyseliny. Může detekovat kontaminaci a jakýkoli typ interakcí primerů nebo sond, které mohou produkovat fluorescenční signál, který by mohl zmást výsledky (Bustin 2002).

Exogenní kontrola je dobře charakterizovaná nukleová kyselina nebo syntetizovaný konstrukt RNA či DNA, vložený do každé reakce ve známé koncentraci. Může sloužit jako interní pozitivní kontrola (IPC) k rozlišení mezi inhibicí PCR a skutečnou negativní reakcí. Používá se také k hledání problémů nekonzistence, ke kterým může dojít při přípravě master mixu (Wong & Medrano 2005).

Endogenní kontrola je nukleová kyselina přítomná v přípravě cílového genu, která může být také detekována pomocí primerů a sondy v reakcích kvantitativní real-time PCR. Může sloužit jako aktivní reference pro normalizaci jakýchkoli rozdílů v množství celkového cíle mRNA přidaného k qRT-PCR reakci (Wong & Medrano 2005).

qRT-PCR musí být také normalizována z hlediska intenzity signálu. Normalizace, korekce kolísání intenzity signálu mezi identickými vzorky (předpoklad), se provádí na dvou úrovních. Jedna pro korekci variace v koncentraci PCR reagentů a druhá pro kompenzaci rozdílů v množství izolované RNA ze vzorků z různých tkání (při použití qRT-PCR k měření genové exprese) (Vandesompele et al. 2002).

Mnoho qRT-PCR experimentů se provádí na mikrotitračních destičkách, které mají 48 až 384 jamek, z nichž každá obsahuje vzorek a amplifikační činidla. Pipetování tolika komponentů může způsobit variace v jamkách, kdy v některých je více či méně činidla. Rozdíly v koncentraci složek mezi paralelními vzorky mohou vést k variabilitě vypočtených hladin zkoumaných genů. Tuto variabilitu lze korigovat zahrnutím pasivní reference do směsi PCR, se kterou se porovnává signál generovaný během amplifikace. Mezi takovou pasivní referencí můžeme zařadit například barvivo označované jako ROX. Je označováno jako pasivní reference, protože se neúčastní jako nezbytná součást amplifikace, ani ji neinhibuje. Pouze svítí červeně (Liu & Saint 2002).

Můžeme například provádět experiment genové exprese qRT-PCR a do jedné jamky mikrotitrační destičky se umístí 200 ng celkové mRNA izolované z jaterních buněk a do jiné se umístí pouze 100 ng celkové mRNA izolované ze svalových buněk. I když ve skutečnosti je cílový gen exprimován v ekvivalentních hladinách v obou typech buněk, zdá se, že gen v jaterních buňkách byl exprimován dvakrát více než v buňkách svalových. Normalizace, ve které je intenzita signálu referenčního barviva rozdělena intenzitou signálu pasivního referenčního barviva, může tento rozpor korigovat. Tím se získá hodnota zvaná jako R_n pro normalizovaný reportér (Wayne et al. 2009).

3.4.5.3 Detekce produktů qRT-PCR

Jsou známé čtyři varianty detektorových sond, z nichž všechny jsou komplementární párem bazí k cílové sekvenci a fluoreskují, když je detekována cílová sekvence. Všechny jsou závislé na excitaci primárního fluoru ultrafialovým (UV) zářením. Primární fluor může být uhašen blízkou druhou molekulou, která je po navázání na templát oddělena od primárního fluoru. Protože sondy jsou zahrnuty v reakční směsi, jsou obecně blokovány na 3' konci, aby se jim zabránilo ve funkci alternativních primerů pro PCR (Stephenson 2016).

Nejjednodušší sonda se nazývá molekulární maják. Skládá se z relativně dlouhé centrální sekce, která je schopna hybridizovat s amplikonem. Krátké sekvence na 3' a 5' koncích jsou komplementární s cílovou sekvencí, ale ne navzájem. Fluor a zhášec jsou vázány na 3' a 5' konce. V nepřítomnosti cílové sekvence drží konce párů bazí zhášec v těsné blízkosti fluoru, takže dopadající UV záření nezpůsobí žádnou fluorescenci. Je-li přítomná cílová sekvence, centrální část se na ni váže komplementárním párováním bazí, což oddělí fluor a zhášec, a tak může docházet k fluorescenci. Protože centrální sekvence je delší než segmenty na 3' a 5' koncích sondy, vazba k cíli upřednostňována, pokud jsou přítomny amplikony. UV světlo excituje fluor a výsledná fluorescence je úměrná počtu přítomných cílových molekul (Tyagi & Kramer 1996).

Další přístup qRT-PCR detekci je přenos energie fluorescenční rezonancí neboli FRET. Jsou vyžadovány dvě sondy FRET. Jsou navrženy tak, že se váží podél cílové sekvence. Jedna obsahuje fluor na svém 3' konci, který excituje v dopadajícím UV záření, ale emituje na vlnové délce, která není detekována přístrojovým vybavením. Druhá sonda má na svém 5' konci jiný fluor, který může být excitován na vlnové délce emitované prvním fluorem. K excitaci druhého fluoru nedochází, když jsou sondy v roztoku. Když jsou navázány na amplikonu, přičemž dva fluory sousedí jeden s druhým, energie z prvního fluoru je přenášena na druhý, který ji znovu emituje na vlnové délce, která je již detekovatelná přístroji. Množství fluorescence v každém cyklu je úměrné počtu přítomných cílových sekvencí (Bernard & Wittwer 2000).

Třetí sonda se obecně nazývá svým vlastním názvem TaqMan. Její funkce závisí na 5' exonukleázové aktivitě Taq polymerázy. Taq polymeráza vykazuje 5'-3' exonukleázovou aktivitu, která degraduje 5' konce sond. Lawyer et al. (1993) geneticky upravil Taq polymerázu nazývanou Stoffel fragment. Nemá 5'-3' exonukleázovou aktivitu a má delší poločas rozpadu (21 minut oproti 9 minutám) při 97,5 °C (Tajadini et al. 2014).

Sonda TaqMan je relativně krátká a obsahuje fluor i zhášec. Fluor je vždy na konci 5'. Zhášec může být vázán v jeho blízkosti, ale mírně dále po molekule nebo na 3' konci. Sonda se váže na komplementární sekvenci amplikonu ve stejnou dobu jako amplifikační primery.

Polymeráza Taq syntetizuje podél řetězce, podstupuje od 5' do 3', dokud se nedostane na 5' konec sondy. Potom pomocí své vlastní 5' exonukleázové aktivity polymeráza degraduje sondu, odděluje fluor od zhášedce a umožňuje fluorescenci. Tato metoda se liší od předchozích dvou v tom, že separace fluoru a zhášedce je trvalá. Protože fluorescence nezávisí na souběžné vazbě sondy k amplikonu, lze ji měřit kdykoli v amplifikačním cyklu (Stephenson 2016).

Scorpion sondy jsou skutečně začleněny do amplikonu. Jsou podobné majákové sondě s fluorem na 5' konci a zhášedcem blízko 3' konce, ale po proudu od zhášedce je navíc blokátor, který zastaví jakoukoli polymerázu Taq, která se pokouší kopírovat kolem sondy a za tím je sekvence komplementární ke 3' konci cílové sekvence. 3' konec není blokován a 3' konec sondy s neporušenou smyčkou se komplementárně váže k templátu a Taq ji rozšiřuje ve směru 3' podél amplikonu. Když syntéza proběhne dostatečně daleko, sekvence smyčky se otevře a otočí se podél tvořícího se řetězce. Tam jsou páry bazí, které posunují 3' konec dvouřetězcového amplikonu. Párování bazí odděluje fluor a zhášedce a světlo může být emitováno. Polymeráza Taq postupuje ve směru 3' a vytváří úplnou kopii templátu. V dalším amplifikačním cyklu je sonda degradována 5'-3' exonukleázovou aktivitou Taq polymerázy (Whitcombe et al. 1999).

3.4.5.4 Měření genové exprese

Schopnost přesně měřit genovou expresi je rozhodující pro pochopení toho, jak např. mohou vzniknout nemocné buňky a jakým způsobem reagují na terapii. Jaké geny se vypnou a jaké geny se zapnou v reakci na testovaný lék k léčbě nemoci nebo v reakci na virovou infekci. Použití qRT-PCR pro kvantifikaci genové exprese má řadu výhod. Například její citlivost je schopna detekovat pouze jednu kopii specifického transkriptu. Kromě toho má qRT-PCR schopnost produkovat data v širokém rozsahu (je schopna přesně detekovat malé i velké množství přepisu), nabízí možnost zpracovávat mnoho vzorků současně a může rozlišovat mezi transkripty, které mají velmi podobné sekvence (Stephenson 2016).

Reakce, které měří rozdíly v genové expresi mezi geny, mají potenciál pro vysokou míru variability. Tato variabilita může být způsobena pipetovací chybou nebo změnou účinnosti amplifikace PCR nebo reverzní transkripční reakce použité k převodu mRNA na cDNA. Tento zdánlivě malý krok může zavést významnou variabilitu do procesu PCR s reverzní transkriptázou. Účinnost syntézy cDNA může být změněna sekundární a terciální strukturou molekul RNA, degradací RNA a povahou enzymu použitého pro reverzní transkripci (Stahlberg et al. 2004).

Variabilita pochází z mnoha zdrojů. V důsledku toho vyžaduje qRT-PCR jako prostředek pro měření genové exprese použití dalších různě navržených prvků.

Endogenní kontrola se používá jako aktivní reference pro normalizaci rozdílů v množství celkové RNA přidané do qRT-PCR reakce. Nejčastěji používanými endogenními kontrolami jsou tzv. housekeeping geny, které jsou vždy exprimovány na více či méně konstantní úrovni pozadí, jak to buňka potřebuje k provádění svých základních životních procesů. Příkladem takových genů je například gen ACTB pro β -aktin a gen pro GAPDH (glyceraldehyd 3- fosfát dehydrogenáza) (Stephenson 2016).

V této diplomové práci byl použit k experimentu housekeepingový gen RPL4 (60S ribozomální protein L4). Tento gen souvisí s ribozomy. Ribozomy jsou orgány katalyzující syntézu proteinů. Skládají se z malé 40S podjednotky a velké 60S podjednotky. Dohromady

jsou tyto podjednotky složeny ze 4 druhů RNA a přibližně 80 strukturně odlišných proteinů. Gen RPL4 kóduje ribozomální protein, který je součástí podjednotky 60S. Protein patří do rodiny ribozomálních proteinů L4E (Su et al. 2019). Endogenní kontrolní gen by měl být na stejném vzorku nukleové kyseliny jako cílový gen zájmu. Může však být amplifikován v oddělené jamce na stejné desce jako cíl nebo může být amplifikován přímo spolu s cílem ve stejné jamce v multiplexní reakci pomocí různých barevně značených sond (Stephenson 2016).

Měření genové exprese pomocí qRT-PCR se nejčastěji provádí jako relativní test. To znamená, že se nemusíme starat o to, kolik molekul mRNA je vyrobeno z konkrétního genu, jen chceme vědět, jaká úroveň transkriptu je porovnávána (relativní) s jiným genem. Tento rozdíl se obvykle vyjadřuje jako násobek rozdílů. Například relativní kvantifikace může být použita pro stanovení rozdílů exprese genů tepelného šoku v rakovinných buňkách ve srovnání s jejich expresí v normálních zdravých buňkách. Používá se pro srovnání exprese specifického genu v jednom typu tkáně ve srovnání s jeho expresí v jiném typu tkáně, zejména pokud byly tyto tkáně nějakým způsobem ošetřeny lékem nebo jiným činidlem (Stephenson 2016).

Existuje několik způsobů, jak změřit relativní kvantifikaci.

Například metoda relativní kvantifikace $\Delta\Delta C_T$. Metoda $\Delta\Delta C_T$, označována také jako srovnávací metoda C_T , je prostředkem k měření relativní kvantifikace a byla poprvé popsána Livakem & Schmittgenem (2001). Určuje relativní změnu v expresi genu mezi zkoumaným cílovým genem a kalibrátorem (referenčním genem). Ačkoli je test určen k měření množství transkriptu (RNA) vytvořeného v konkrétní buňce, v qRT-PCR reakci je ve skutečnosti cDNA vytvořena reverzní transkripcí celkové RNA získané z buněk, jejichž genová exprese je studována (Stephenson 2016).

Rozdíl mezi C_T cílového genu (target) a C_T endogenní kontroly (ec) se označuje jako ΔC_T vzorku:

$$C_{T, \text{target}} - C_{T, \text{ec}} = \Delta C_T$$

Podobně ΔC_T kalibrátoru se rovná C_T cílového genu ve vzorku neošetřeném (calibrator target) mínus C_T endogenní kontroly ve vzorku neošetřeném (calibrator ec):

$$C_{T, \text{calibrator target}} - C_{T, \text{calibrator ec}} = \Delta C_{T, \text{calibrator}}$$

Termín $\Delta\Delta C_T$ se počítá jako rozdíl hodnot ΔC_T cílového genu v ošetřeném vzorku a ΔC_T cílu v neošetřeném kalibračním vzorku:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T, \text{target in treated sample}} - \Delta C_{T, \text{target in calibrator sample}}$$

Kalibrátor, protože je neošetřený, by neměl mít v průběhu experimentu žádnou změnu své hodnoty $\Delta\Delta C_T$. Jeho změna je tedy rovna nule. Protože se 2^0 rovná jedné, exprese kalibrátorového genu je jednotná. Pokud se k měření genové exprese použije metoda $\Delta\Delta C_T$, jsou výsledky vyjádřeny jako násobná změna úrovně exprese cílového genu normalizovaná na endogenní kontrolu vzhledem ke kalibrátoru. Je dáno rovnicí:

$$\text{Relativní změna} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Existuje mnoho dalších metod ke zkoumání exprese genů jako je např. analýza transkriptu pomocí prodlouženého primeru, sekvenování RNA, DNA microarray a subtraktivní hybridizace. Tyto metody nebudu dále popisovat z důvodu limitů diplomové práce.

3.5 Exprese genů při oogenezi a zrání oocytů

Oocyt je jako jedna z největších buněk v těle samičí gametou pro reprodukci. Během vytváření oocytů a následného zrání a vývoje podléhá oocyt dynamickým procesům, které zahrnují složité regulační mechanismy v různých stádiích. Primordiální zárodečné buňky (PGC) prochází mitózou a vytvářejí oogonie ve vaječniku plodu. Během procesů oogeneze se oogonie dělí a vstupují do fáze meiózy I a stávají se primárními oocyty, které se zastaví ve fázi profáze meiózy I (Li et al. 2019).

Po pubertě primární oocyt dokončí meiózu I a dělí se na haploidní sekundární oocyt a vydělí se první polární tělísko. Pouze jeden sekundární oocyt zraje a ovuluje. Když tento sekundární oocyt vstoupí do meiózy II, je zastaven ve stadiu metafáze meiózy II (MII) až do oplodnění. Po oplození je proces meiózy ukončen a je vyloučeno druhé polární tělísko (MacLennan et al. 2015).

Celý proces folikulogeneze a ovulace je řízen folikuly stimulujícím hormonem (FSH) a luteinizačním hormonem (LH), které jsou vylučovány z hypofýzy. Jsou kontrolovány estradiolem, progesteronem, inhibinem a dalšími hormony, které jsou většinou produkovány vaječníky (Shoham 2002). Komunikace mezi vaječníky a hypothalamicko-hypofyzární jednotkou je proto nezbytná pro perzistující ovulaci.

Expresa a regulace genů během oogeneze přispívá k materiálnímu základu samičích gamet a k následnému oplodnění. Oogeneze je přísně regulována, což vede k produkci funkčních oocytů. Oogeneze u savců zahrnuje tři klíčová období: proliferaci a migraci PGC, tvorbu folikulů, aktivaci a růst folikulů (Shibuya & Watanabe 2014).

Tyto události vedou k produkci vývojově kompetentních oocytů schopných oplodnění v budoucnosti. Diferenciace a vývoj PGC je charakterizovaný dynamickou a pozoruhodnou změnou v genové expresi, z nichž většina změn je regulována řadou transkripčních faktorů. Práce Markholta et al. (2012) ukazuje více než 6000 genů, které jsou významně exprimovány. Obousměrné interakce mezi zárodečnými buňkami a okolními granulózními buňkami (GC) jsou také nezbytné k vytvoření ovariálního folikulu (Li et al. 2019).

Studie genové exprese a regulace jsou zásadní pro lepší porozumění mechanismů udržování a aktivace folikulů, a tím usnadňují reprodukční biologii.

3.5.1 Genová exprese při PGC migraci a proliferaci

PGC jsou prekursori oocytů a jsou rozhodující pro udržení druhu. V samičích pohlavních žlázách se PGC diferencují mitózou na oogonie. Podléhají masivní proliferaci a poté se stávají primárními oocyty, které se zastavují v profázi prvního meiotického dělení (Elkouby 2017).

Do procesu migrace PGC je zapojena řada faktorů, včetně členů rodiny transformujících se růstových faktorů beta (TGF β) a transkripčních faktorů odvozených ze zárodečných buněk (Sanchez & Smitz 2012). Mezi transkripční faktory, které hrají důležitou roli v přežití, migraci a proliferaci PGC patří SOX17, BLIMP1, PRDM14, OCT4, NANOG, FIG α , NANOS3 a DND1 (Irie et al. 2015).

Neúplným dělením cytoplazmy (neúplná cytokineze) během mitózy tvoří oogonie struktury, které se vyvinou v ovariální folikuly (Baltus et al. 2006). Růstová fáze oogeneze se

zahajuje, když oogonie dokončí mitotické dělení, spolu s jejich zvětšením, za vzniku primárních oocytů a iniciace meiózy. Během 11–20 týdnů embryonálního života před narozením je u lidí zahájeno první meiotické dělení v primárních oocytech. Během tohoto procesu je několik proteinů vázajících RNA, například DAZL a BOLL, zapojeno do různých stádií lidského meiotického dělení (He et al. 2013).

PGC reagují na signály vylučované sousedními somatickými buňkami prostřednictvím interakcí receptor / ligand, aby usnadnily jejich migraci do vyvíjejících se gonád. KITL (ligand pro receptor KIT) uvolněný buňkami granulózy, rozpoznává svůj receptor na oocytu, což vyvolává vývoj gonád (Merkwitz et al. 2011).

3.5.2 Genová exprese při formaci primordiálního folikulu

Po migraci a proliferaci PGC vstupuje oocyt do stadia diplotene během profáze meiózy I a je zastaven v prodloužené klidové fázi (Baltus et al. 2006).

U lidí dochází k tvorbě primordiálních folikulů během druhého trimestru vývoje plodu a je dokončeno před narozením (Pepling 2006). Během tvorby primordiálních folikulů je primární oocyt obklopen buňkami ovariálních stromálních buněk (pregranulosa), aby vytvořily jednovrstvé primordiální folikuly. Signalizace STRA8 (stimulovaná genem 8 kyseliny retinové), závislá na stimulaci signální kyseliny retinové, se podílí na iniciaci meiózy v lidském i myším vaječnicku (Baltus et al. 2006). Studie na modelových organismech ukazují, že estrogen a odpovídající receptory jsou zapojeny do tvorby primordiálních folikulů. Faktory a signální dráhy u lidí však musí být prozkoumány. Tvorba primordiálních folikulů je spojena s apoptózou velkého počtu oocytů. Různé pro- a antiapoptotické proteiny jsou významné a zapojené při určování osudu zárodečných buněk během tvorby primordiálních folikulů (Findlay et al. 2015).

Tyto proteiny zahrnují členy rodiny BCL, BCL2 a BCLX a proapoptotický protein BAX. Bylo prokázáno, že nepřítomnost BCL2 nebo BCLX má za následek snížený počet primordiálních folikulů, zatímco ztráta aktivity BAX nebo kaspázy 2 vede ke zvýšení zásob primordiálních folikulů. Primordiální folikuly přítomné při narození naznačují, že jsou přítomny zárodečné buňky a jsou dostupné během reprodukčního života žen. Mutace nebo dysfunkce kteréhokoli z genů zapojených do migrace a přežití PGC, regulace tvorby folikulů a apoptózy tedy může vést ke snížení fondu zárodečných buněk a následně ovlivnit reprodukční rozsah ženy (Sanchez & Smitz 2012).

3.5.3 Genová exprese při aktivaci a vývoji folikulu

Signální interakce mezi oocyty a okolními granulózními buňkami zaručuje vysoce komplexní a dynamickou aktivaci a vývoj folikulů. Před aktivací zůstávají primordiální folikuly nečinné až do puberty a poté se aktivují. Po aktivaci primordiálních folikulů se oocyty zvětší a zploštělé buňky granulózy se vyvinou do tvaru kvádrů a přejdou do proliferačního stavu (Li et al. 2010).

Aktivace primordiálních folikulů je regulována řadou genů. Signalizace PTEN / PI3K byla identifikována jako klíčová pro přechod z primordiálních na primární folikuly. Homolog fosfatázy a tensinu deletovaný na chromozomu 10 (PTEN) vede k inaktivaci fosfatidylinositol 3 kinázy (PI3K), serin threoninové proteinové kinázy, která stimuluje buněčnou proliferaci a potlačuje expresi proapoptotického faktoru O3 (FOXO3). Studie na myších a lidských ováriích

ukazují, že manipulace s cestou PTEN / PI3K inhibicí PTEN a aktivací PI3K indukuje aktivaci primordiálních folikulů (Li et al. 2010).

Další signální dráha je zprostředkována signální transdukcí Tsc / mTORC1. Bylo také prokázáno mnoho dalších životně důležitých faktorů, včetně ligandu KIT a jeho receptoru, neurotrofinů, transkripčních faktorů Nobox a Sohl1 a členů rodiny TGFβ BMP4, BMP7 a antimüllerovského hormonu (AMH) (Sanchez & Smits 2012).

Jak folikuly rostou, tvoří se zona pellucida na povrchu primárního oocyty a kubické somatické buňky získávají další vrstvy, což označuje postup do sekundární a antrální fáze. Pouze několik oocytů postupuje maturací v každém cyklu. V této fázi jsou potřebné faktory zahrnující GDF9, BMP15, TATA box-vazebný protein 2 (TBP2) a TATA box-vazebný protein (TBP) asociovaný faktor (TAF4B) (Gazdag et al. 2009). Rané vývojové stádium ovariálních folikulů je nezávislé na folikulo-stimulačním hormonu (FSH) a je kontrolován místně sekretovanými faktory, a poté přechází na FSH-závislý způsob, když dosáhne antrálního stádia. Těsně před ovulací dokončí primární oocyt první meiotické dělení, což má za následek vytvoření sekundárního oocyty a vytlačení prvního polárního tělíska, malé nefunkční buňky, která se následně degeneruje. Druhé meiotické dělení začíná okamžitě při ovulaci a dokončuje se po oplodnění, což vede k vytvoření haploidní ootidy s extruzí druhého polárního tělíska (MacLennan et al. 2015).

Kromě genů exprimovaných v oocyty se ukázalo, že během folikulogeneze hrají důležitou roli transkripční regulátory exprimované v okolních buňkách. Obousměrná komunikace oocyty a buněk granulózy je jedním z klíčových mechanismů získání vývojové kompetence oocytů. Aktivace signalizace NOTCH v granulózních buňkách (GC) pomocí ligandů ze sousedních zárodečných buněk zdůrazňuje roli signalizace NOTCH v proliferaci a diferenciaci GC. Kromě toho se ukázalo, že členové rodiny TGF-P, faktory odvozené z oocytů GDF9 a BMP15, se podílejí na maturaci oocytů, proliferaci GC a biosyntéze cholesterolu (Su et al. 2008). Kromě toho je KITLG a jeho receptor KIT exprimován v GC a oocytech a hraje klíčovou roli při aktivaci primordiálních folikulů (Thomas & Vanderhyden 2006).

V posledních desetiletích bylo dosaženo významného pokroku při objasňování molekulárních mechanismů, kterými se řídí genová exprese oogeneze. Vzhledem k nepřístupnosti lidských vaječníků byly předchozí znalosti získány hlavně na základě studií na myších. Klíčové role proteinů exprimovaných během oogeneze byly objasněny pomocí knockoutových přístupů nebo cílených delecí u myší. Mnoho otázek však zůstává nezodpovězeno. Hromadící se důkazy ukázaly, že lidské PGC mají jedinečnou genovou expresní síť odlišnou od myší. Očekává se, že technologický pokrok, představovaný například analýzami rozlišení jednotlivých buněk, přispěje ke společnému úsilí o posílení našeho porozumění o oogenezi u lidí (Li et al. 2019).

3.5.4 Genová exprese při dozrání oocytů

Vaječník savců obsahuje tisíce primordiálních folikulů, které se tvoří během vývoje plodu nebo krátce po narození. Každý primordiální folikul obsahuje jeden oocyt, který je zadržen v diplotene první meiotické profáze. Po narození jsou savčí oocyty zastaveny ve fázi diakineze profáze I ve vaječniku, což je známo jako stadium zárodečných váčků (GV). Meióza

pokračuje, jakmile se zárodečný vezikul rozpadne (GVBD) po stimulaci luteinizačním hormonem (LH) na začátku puberty (Verlhac & Terret 2016).

Obnovená meióza I postupuje přes metafázi I (MI), když se homologní chromozomové páry pohybují společně podél metafázové roviny, následuje segregace homologních chromozomů. Po vyloučení prvního polárního tělíska se meióza II iniciuje bez replikace DNA. Tento proces je podobný mitóze a zahrnuje rovnou segregaci sesterských chromatid po degradaci kohezinu. Výsledkem je, že počet kopií DNA se sníží na polovinu (Sun & Kim 2012).

V posledních letech umožnil vývoj různých analýz vyhodnocení změny genové exprese v myších a lidských oocytech. V mikročipové analýze Cui et al. (2007) zkoumali 12 164 genů v oocytech GV a MII u myší. Jejich práce ukázala, že při srovnání GV stádia s MII stádiem v myších oocytech bylo v oocytech stádia GV upregulováno více než 1600 genů, zatímco u oocytů stádia MII bylo upregulováno více než 1900 genů. Přítomné geny v MII oocytech se kromě toho mohou účastnit na metabolismu aminokyselin, signalizace spojené s G proteinem, replikace DNA a na expresi signalizačních molekul.

mRNA syntetizované během růstu oocytů přispívají (před aktivací zygotického genomu) v období časného embryonálního vývoje. Mateřské mRNA v myších oocytech jsou neobvykle stabilní během růstové fáze s průměrným poločasem přibližně 10–14 dnů ve srovnání s hodinami nebo minutami v somatických buňkách (Ma et al. 2013).

Su et al. (2008) objasnili, že dochází ke zničení transkriptů během přechodu GV na MII a že tento proces je spíše selektivní. Kromě toho zjistili, že dramaticky degradované transkripty byly zapojeny ve fázi meiotického zastavení ve stadiu GV, v oxidační fosforylaci, byly spojeny s tvorbou energie a syntézou proteinů a metabolismem, zatímco stabilní transkripty byly zapojeny hlavně do signálních drah, které byly důležité pro udržení charakteristických znaků MII oocytů. Zvýšená koncentrace cAMP, který je produkován z ATP, udržuje v oocytech zastavení meiózy. Proto byly transkripty spojené s oxidativní fosforylací a produkcí energie downregulovány v MII oocytech, aby se získala meiotická kompetence k dokončení meiotického dělení (Su et al. 2007).

Dále byla pozorována podobná změna transkriptomu při maturaci lidských oocytů. Například byl porovnán genový expresní vzorec lidských oocytů ve GV a MI stádiích a výsledky ukázaly, že během těchto dvou nezralých stádií dochází k drobným změnám. Naproti tomu oocyty ve stadiu MII vykazovaly výraznou nadměrnou expresi 444 genů a významně sníženou expresi 803 genů ve srovnání s nezralými oocyty, což naznačuje, že k dramatické změně exprese genů došlo v posledním stádiu zrání oocytů. Ve stadiu MII se objevilo mnoho reprezentativních genů, které byly spojeny s klíčovými biologickými procesy, jako je mitotický buněčný cyklus, replikace DNA a oplodnění. Také se zjistilo, že v oocytech se úroveň exprese 1514 genů zvýšila nejméně trojnásobně, včetně *Dazl*, *Ddx4 / Vasa* a *Dppa3 / Stella* (Assou et al. 2011).

Bylo také detekováno mnoho dobře známých členů meiózy – například složky faktoru podporujícího zrání (MPF), komplexu podporujícího anafázi (APC / C) a kohesin. Jak se očekávalo, byly také pozorovány geny, které jsou považovány za specificky exprimované v oocytech, jako jsou *ZP1*, *2*, *3* a *4*, *Gdf9*, *Bmp6*, *Fgfr2*, *Hdac9* a oocytově specifický H1 histon *H1FOO*. Je zajímavé, že bylo objeveno několik genů, o nichž bylo hlášeno, že jsou exprimovány v samčích zárodečných buňkách a byly také vysoce exprimované v oocytech. Byly to například geny *Aurkc*, *Sox30* a *Spag16 / PF20* (Giritharan et al. 2007).

Kromě toho je známo, že proteazom interaguje s chromatinem během několika fází transkripce. Některé studie také pozorovaly, že geny související s proteazomy hrály významnou roli během zrání lidských oocytů. Heterodimer BARD1-BRCA1 byl považován za ubikvitin ligázu E3. Multiproteinový ubikvitin ligázový komplex E3 obsahující BARD1, BRCA1 a BRCA2 se účastnil zrání lidských oocytů. Tyto proteiny hrají klíčovou roli v regulaci postupu buněčného cyklu, opravy DNA a transkripce genu (Giritharan et al. 2007).

Během období zrání jsou oocyty závislé na předpřipravených zásobách RNA pro svůj proces zrání a přibližně polovina transkriptů je zničena (Giritharan et al. 2007).

Expresní vzorec maturace oocytů byl identifikován jako zvláště citlivý na prostředí. U savců buněčná adheze, buněčná homeostáza, interakce buňka-buňka a stabilita nebo translace mRNA mohly vést k různé expresi mRNA mezi oocyty zrajícími in vivo a in vitro (Lee et al. 2008).

3.5.5 Regulace translace v oocytech

Během maturace oocytů bude řada mRNA převedena na proteiny, které jsou specificky vyžadovány pro funkci oocytů, zatímco další sada mRNA bude translatována později v embryonálním období po oplození (Li et al. 2019).

Ukázalo se, že během zrání oocytů bylo translatováno přibližně 7600 mRNA. Tato zjištění proběhla pomocí mikročipové analýzy RNA izolované z polyzomů oocytů ve stadiích GV, MI a MII (Chen et al. 2011). Translace některých mRNA je nezbytná pro progresi maturace a vývoje oocytů. Například protein Cyclin B1 syntetizovaný z uložené mRNA tvoří komplex nazvaný MPF s preexistující Cdc2 kinázou a okamžitě aktivuje Cdc2. MPF fosforyluje stovky substrátů, aby správně podporoval cykly meiotických buněk, jakož i cytoplazmatickou a jadernou maturaci (Li et al. 2019).

4 Materiál a metodika

4.1 Použité tkáně

Zaměstnanci Katedry veterinárních disciplín FAPPZ ČZU v Praze byli schopni získat čerstvé vzorky tkání z jatek a vzorky oocytů z prasnic plemene Bílé ušlechtilé. Tkáňové vzorky byly získány z plic, jater, dělohy, srdce, sleziny a vaječníku, měly velikost přibližně 2x2 cm a byly vloženy do falkonů o objemu 50 ml. Vzorky byly dále uloženy na suchý led po dobu přepravy a poté okamžitě vloženy do mrazicího zařízení o teplotě -80 °C, kde byly uchovány do doby jejich další úpravy. Byly získány různé tkáně od tří prasnic. Tkáň z dělohy byla získána pouze z jedné prasnice, a proto nebyla využita k hlavnímu experimentu qRT-PCR.

Vzorky byly rozřezány na menší kousky o hmotnosti cca 30 mg, vloženy do homogenizačních zkumavek Precellys (Bertin Instruments) o objemu 1,5 ml a okamžitě přeneseny do tekutého dusíku z důvodu ochrany RNA před degradací. Vzorky byly následně použity v procesu izolace RNA.

Všechny použité zkumavky byly RNase Free a povrchy laboratoře a použité nástroje byly ošetřeny přípravkem RNase ZAP TM od firmy Sigma.

Dále byly připraveny dva vzorky oocytů ve fázi zárodečného vajíčka GV. V prvním vzorku bylo 50 oocytů (50 OV) a ve druhém 20 oocytů (20 OV). Pro experiment jsou používány oocyty z vaječníků prasnic v různém stádiu pohlavního cyklu. Vaječníky jsou odebírány na jatkách přímo z odporažených zvířat. Poté jsou ihned převáženy do laboratoře ve fyziologickém roztoku (0,9% chlorid sodný) o teplotě 39°C.

V laboratoři jsou vaječníky zpracovávány do dvou hodin od porážení zvířete. Z vaječnicků se získávají oocyty aspirací folikulární tekutiny pomocí jehly 20G. Aspirovány jsou folikuly o průměru 2–5 mm. Následně se pod binokulární lupou z folikulární tekutiny vybírají oocyty pomocí tenké skleněné kapiláry.

Pro experimenty jsou využívány oocyty s neporušenou cytoplazmou a s kompaktním kumulem. Manipulace s oocytami probíhá v modifikovaném médiu M199 (USOL Praha, Česká republika), obsahujícím hydrogenuhličitan sodný (0,039 ml 7% roztoku na 1 ml média), laktát vápenatý (0,6 mg/ml), pyruvát sodný (0,25 mg/ml), gentamicin (0,025 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml), 10 % bovinního séra (Gibco BRL, Life Technologies) a 13,4 IU eCG/ml (P.G. 600, Intervet, Boxmeer, Holand). Poté jsou oocyty promyty v PBS s 1 % PVA a přeneseny do homogenizační zkumavky Precellys (Bertin Instruments) a použity v dalším postupu izolace RNA.

Tabulka 1 Označení tkání

Biologický replikát α	Plíce	Játra	Děloha	Srdce	Slezina	Vaječník
Prasnice 1	1ARα	1BRα	1CRα	1DRα	1ERα	1FRα
Prasnice 2	2ARα	2BRα	Nebylo k dispozici	2DRα	2ERα	2FRα
Prasnice 3	3ARα	3BRα	Nebylo k dispozici	3DRα	3ERα	3FRα
Biologický replikát β	Plíce	Játra	Děloha	Srdce	Slezina	Vaječník
Prasnice 1	1ARβ	1BRβ	1CRβ	1DRβ	1ERβ	1FRβ
Prasnice 2	2ARβ	2BRβ	Nebylo k dispozici	2DRβ	2ERβ	2FRβ
Prasnice 3	3ARβ	3BRβ	Nebylo k dispozici	3DRβ	3ERβ	3FRβ

Tabulka 2 Označení vzorků oocytů

Oocyty	20 OV	50 OV
--------	-------	-------

4.2 Izolace celkové RNA

K izolaci totální RNA byl použit kit firmy Sigma, Aldrich Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep. Byl dodržen následující postup:

1. Byl přehřát termoblok Bio TDB-120 (Biosan) na 55 °C (Obr.27)
2. Byly připraveny homogenizační zkumavky Precellys (Bertin Instruments) s 25-40 mg tkáně
3. Do zkumavek bylo rychle přidáno 300 µl Lysis Solution/2-ME a vzorek se homogenizoval 180 sekund v homogenizátoru Minilys (Bertin Instruments) (viz Obr. 27)
4. Bylo přidáno 590 µl H₂O (RNase-free) a 5 µl Proteinase K
5. Vzorek byl promíchán a inkuboval se při 55 °C v termobloku (viz Obr. 27)
6. 700 µl vzorku bylo přeneseno do zkumavky s filtrem a centrifugoval se rychlostí 12 000 RPM po dobu 2 minut
7. Zopakoval se krok 6 a filtráty se spojily
8. Dále se přidalo 450 µl Ethanolu a důkladně se vzorek promíchal ve vortexu
9. Byla použita vazebná kolonka, do které se napipetuje 700 µl lyzátu/ethanol a vzorek se centrifuguje při rychlosti 12 000 RPM po dobu 15 sekund
10. Proteklá kapalina byla vylita a bylo přidán zbytek lyzátu/ethanol na vazebnou kolonku a proběhla centrifugace při rychlosti 12 000 RPM po dobu 15 sekund
11. Proteklá kapalina byla vylita
12. Na kolonku se napipetovalo 250 µl Wash Solution I a proběhla centrifugace při rychlosti 12 000 RPM po dobu 15 sekund, kapalina byla znovu vylita
13. Přidalo se 80 µl (10 µl DNasa + 70 µl pufr DNasa) na filtr a vzorek se nechal v klidu stát 15 minut při pokojové teplotě
14. Na kolonku se následně napipetovalo 250 µl Wash Solution I a vzorek se centrifugoval při rychlosti 12 000 RPM po dobu 15 sekund, zkumavka se vyměnila
15. Na kolonku bylo napipetováno 500 µl Wash Solution II a vzorek byl centrifugován při rychlosti 12 000 RPM po dobu 2 minut do sucha
16. Dále došlo k přendání filtru do nové 2 ml zkumavky
17. Bylo napipetováno ke vzorku 50 µl Elution Solution a proběhla centrifugace při rychlosti 12 000 RPM po dobu 1 minuty
18. Konečný produkt byl získán ve zkumavce



Obrázek 27 Homogenizátor Minilys firmy Bertin Instruments a termoblok Bio TDB-120 firmy Biosan

4.3 Koncentrace a absorbance izolované RNA

Byla provedena spektrofotometrická analýza ke stanovení koncentrace a absorbance izolované totální RNA. Analýza byla provedena pomocí přístroje NanoPhotometer (Implen), který zjistil kvantitu pomocí UV spektrofotometru (viz Obr. 28). Přístroj byl kalibrován 3 μ l pufru Elution Solution a následně byly postupně přidávány vzorky na čtecí místo spektrofotometru také v množství 3 μ l.

Přístroj zjistil koncentraci a zhodnotil parametry A260/A280 a A260/230. Tyto dvě hodnoty určují úroveň čistoty nukleových kyselin. Hodnoty u RNA by se měly pohybovat kolem 2.

Hodnota A260/A280 určuje míru znečištění proteiny. Hodnota A260/A230 je použita jako sekundární míra čistoty nukleových kyselin. Tato hodnota určuje přítomnost jiných kontaminantů, které absorbují záření při 230nm, například EDTA, fenoly nebo karbohydráty. Pokud jsou hodnoty vyšší než 2, došlo k určitému znečištění nukleových kyselin.



Obrázek 28 NanoPhotometer

4.4 Přepis RNA na cDNA

Reverzní transkripce je syntéza komplementární deoxyribonukleové kyseliny DNA z jednořetězcového templátu ribonukleové kyseliny RNA. Tento proces je katalyzován enzymem reverzní transkriptázou (RNA-dependentní DNA polymeráza), který je replikačním enzymem retrovirů. Kromě své RNA-dependentní DNA polymerázové aktivity má také slabou DNA-dependentní DNA polymerázovou aktivitu, která postrádá 3' → 5' exonukleázovou aktivitu a RNáza H aktivitu, která degraduje RNA templát z hybridních řetězců RNA / DNA, jak probíhá syntéza DNA.

V přítomnosti všech čtyř deoxynukleotidů (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a za dobře definovaných podmínek reverzní transkriptáza nasedá na primer komplementární k RNA, aby vytvořila komplementární DNA (cDNA).

K přepisu byl použit kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis od firmy Roche a byl použit univerzální polyA primer.

K přepisu jsme potřebovali 12 μ l izolované RNA, 1 μ l primeru a 7 μ l Master mixu. Master mix obsahuje 4 μ l RT pufru (Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer), 0,5 μ l protektoru (Protector RNase Inhibitor), 2 μ l směsi dNTP a 0,5 μ l reverzní transkriptázy (Transcriptor Reverse Transcriptase).

K RNA byl přidán primer a vzorek denaturoval při teplotě 65°C. Primer tak nasedá pouze na mRNA a eliminují se tak ostatní RNA molekuly. Následně byla směs ochlazená. Byl přidán Master mix a vzorky byly inkubovány v termocykleru DNA Engine (Biorad) (viz Obr. 29) po dobu 60 minut při 50°C.

Takto získaná cDNA byla uložena při teplotě -20°C. Pro qRT-PCR byla koncentrace výsledné cDNA vysoká a vzorky musely být naředěny tak, aby v 1 μ l roztoku bylo takové množství cDNA, které odpovídá produktu reverzní transkripce vzniklého z 0,75ng celkové RNA.



Obrázek 29 Termocykler DNA Engine firmy Biorad

4.5 Navrhování a optimalizace primerů

Primery byly navrženy pomocí programu Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000). Pro navržení primerů byla použita sekvence transkriptu *HMOXI*-202 ENSSSCG00000039745, scaffold AEMK02000361.1, uvedené v mezinárodní databázi Ensembl. Bylo navrženo 11 primerů pro gen *HMOXI* A-K. Současně s navržением primerů genu *HMOXI* A-K byly navrženy primerové páry pro další tři housekeepingové geny *RPL4*, *ACTB* a *TBP*.

Vzhledem k tomu, že gen *TBP* vykazoval mírnou nescifickou amplifikaci a gen *ACTB* se výrazně odlišoval eficientí, jsou v tabulce 3 uvedeny jen primery pro housekeepingový gen *RPL4*, který byl použit ve vlastních analýzách.

Specifičnost nasedání primerů v rámci genomu *Sus scrofa* byla hodnocena pomocí programu Primer BLAST (viz Obr. 30-41), který je součástí mezinárodní databáze NCBI. Bylo zjištěno, v jaké části referenčního genomu nasedají a jak velký by měly tvořit produkt. Pozice primerů byly vyhledány v referenční sekvenci reprezentativního genomu *Sus scrofa* 11.1 NW_018084968 (GCF_000003025.6), plemene Duroc, izolátu TJ Tabasco. Tímto vyhledáváním bylo ověřeno, že neexistuje jiné místo v genomu, kde by primery mohly nasedat a že tedy existuje jen jedno specifické místo nasedání.

Primery *HMOXI* F a *HMOXI* I nebyly 100% komplementární k výchozí sekvenci. Je to dané použitím jiného plemene a změna bazí je u primerů na 5' konci, tudíž tato změna by neměla mít vliv na nasedání primerů.

Z tabulky 3 je patrné, že hodnota *tm* byla u všech navržených primerů vyšší než 60°C. Primery byly navrhovány záměrně s takto vysokou hodnotou *tm* proto, aby u všech primerových párů bylo dosaženo specifické amplifikace při anelační teplotě 64 °C.

Tabulka 3 Navržené primerové páry pomocí Primer3 (vyznačení v sekvenci v příloze 1.)

Primer	len	tm	gc%	seq	PS	Oblast nasedání
A Forward	18	67,29	72,22	ACCCCGTCGCGAGCTGTC	188	Exon 1
A Reverse	24	64,21	45,83	CTCGCCCTTCTGAAAGTTCTTCAT		Exon 2
B Forward	24	64,41	50,00	GATGGCGTCCTTGTACCACATCTA	187	Exon 3
B Reverse	19	62,81	63,16	CTTGGTGGCCTGCGTG TAG		Exon 3
C Forward	23	64,16	43,48	ATGTGAATGCAACCCTGTGAATG	188	Exon 6
C Reverse	24	64,01	45,83	GGAAAGATGCCACAGACTCCTTTT		Exon 6
D Forward	24	64,70	50,00	ATGGGTCCTGACACTCAGCTTTCT	219	Exon 6
D Reverse	21	64,15	57,14	TTCCAGCAAGAGGGAGAGACG		Exon 6
E Forward	21	64,08	61,90	AGAGAGGGACAAGGGGTCCAG	219	Exon 6
E Reverse	24	64,24	45,83	ACGGAAACACGAGACACAACATCT		Exon 6
F Forward	24	63,01	50,00	GTCCTCAAGAAGATCGCTCAGAAG	206	Exon 4
F Reverse	24	64,10	45,83	AACAGCTGAATGTTGAGCAGGAAG		Exon 5/6
G Forward	23	65,08	52,17	ATTTGTCAGAGGCCCTGAAGGAG	180	Exon 2
G Reverse	24	63,03	45,83	GGTTCTCCTTGTGTGCTCAATCT		Exon 3
H Forward	20	64,03	65,00	CAGGAGGCCATCCCCTACAC	211	Exon 3
H Reverse	23	64,15	47,83	CGACATTGGGGAAAGTGAAGAAG		Exon 4
I Forward	24	66,06	50,00	ATTCAGCTGTTTGTGAGGAGGTGCAG	204	Exon 5/6
I Reverse	23	64,07	52,17	CACCAGAAAGCTGAGTGTGAGGA		Exon 6
J Forward	24	63,76	54,17	CCAGACTGTCTCCAAGGATCAGAG	181	Exon 1
J Reverse	24	64,07	41,67	TGGCTCATGATAAGGCTGTTGTTT		Exon 1
K Forward	24	63,90	45,83	ATTGCCATGAACTGTGGTGTAGGT	198	Exon 1
K Reverse	24	64,09	45,83	GGGAGCCTAAATGACAAAACGAAC		Exon 1
RPL4 F	24	63,44	41,67	ACTGAAAGCCAAATCAGGTGAGAA	199	Exon 11
RPL4 R	24	64,10	45,83	CTTTTCTTCTGTGGTGGGCTTCTT		Exon 11

(len: délka primeru, tm: teplota tání, gc%: procento G a C bází v primeru, seq: sekvence primeru ve směru 5'-3', PS: očekávaná velikost vytvářeného produktu)

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACCCCGTCGCGAGCTGTC	18	64.73	72.22	6.00	2.00
Reverse primer	CTCGCCCTTCTGAAAGTTCTTCAT	24	61.10	45.83	5.00	2.00

Products on target templates

>[NW_018084968.1](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc unplaced genomic scaffold, Sscrofa11.1 Contig1878

```
product length = 1522
Forward primer 1      ACCCCGTCGCGAGCTGTC 18
Template          1954837 ..... 1954854

Reverse primer 1      CTCGCCCTTCTGAAAGTTCTTCAT 24
Template          1956358 ..... 1956335
```

Obrázek 30 BLAST vyhodnocení dvojice primerů A

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GATGGCGTCCTTGTACCACATCTA	24	62.24	50.00	6.00	2.00
Reverse primer	CTTGGTGGCCTGCGGTAG	19	61.03	63.16	4.00	2.00

Products on target templates

>[NW_018084968.1](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc unplaced genomic scaffold, Sscrofa11.1 Contig1878

```
product length = 187
Forward primer 1      GATGGCGTCCTTGTACCACATCTA 24
Template          1959427 ..... 1959450

Reverse primer 1      CTTGGTGGCCTGCGGTAG 19
Template          1959613 ..... 1959595
```

Obrázek 31 BLAST vyhodnocení dvojice primerů B

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATGTGAATGCAACCCTGTGAATG	23	60.06	43.48	4.00	0.00
Reverse primer	GGAAAGATGCCACAGACTCCTTTT	24	61.29	45.83	4.00	1.00

Products on target templates

>[NW_018084968.1](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc unplaced genomic scaffold, Sscrofa11.1 Contig1878

```
product length = 188
Forward primer 1      ATGTGAATGCAACCCTGTGAATG 23
Template          1963220 ..... 1963242

Reverse primer 1      GGAAAGATGCCACAGACTCCTTTT 24
Template          1963407 ..... 1963384
```

Obrázek 32 BLAST vyhodnocení dvojice primerů C

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATGGGTCTGACACTCAGCTTTCT	24	63.63	50.00	5.00	1.00
Reverse primer	TTCCAGCAAGAGGGAGAGACG	21	61.50	57.14	3.00	2.00

Products on target templates

>[NW_018084968.1](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc unplaced genomic scaffold, Sscrofa11.1 Contig1878

```
product length = 219
Forward primer 1      ATGGGTCTGACACTCAGCTTTCT 24
Template          1963165 ..... 1963188

Reverse primer 1      TTCCAGCAAGAGGGAGAGACG 21
Template          1963383 ..... 1963363
```

Obrázek 33 BLAST vyhodnocení dvojice primerů D

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGAGAGGGACAAGGGTCCAG	21	62.67	61.90	4.00	1.00
Reverse primer	ACGGAAACACGAGACACAACATCT	24	62.76	45.83	3.00	2.00

Products on target templates

>[NW_018084968.1](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc unplaced genomic scaffold, Sscrofa11.1 Contig1878

```
product length = 219
Forward primer 1      AGAGAGGGACAAGGGTCCAG 21
Template          1963444 ..... 1963464

Reverse primer 1      ACGGAAACACGAGACACAACATCT 24
Template          1963662 ..... 1963639
```

Obrázek 34 BLAST vyhodnocení dvojice primerů E

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTCCCTCAAGAAGATCGCTCAGAAG	24	60.97	50.00	4.00	1.00
Reverse primer	AACAGCTGAATGTTGAGCAGGAAG	24	61.82	45.83	6.00	1.00

Products on target templates

>[NW_018084968.1](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc unplaced genomic scaffold, Sscrofa11.1 Contig1878

```
product length = 206
Forward primer 1      GTCCTCAAGAAGATCGCTCAGAAG  24
Template        1959712 ..... 1959735

Reverse primer 1      AACAGCTGAATGTTGAGCAGGAAG  24
Template        1959917 CT..C..... 1959894
```

Obrázek 35 BLAST vyhodnocení dvojice primerů F

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATTGTGTCAGAGGCCCTGAAGGAG	23	62.21	52.17	8.00	2.00
Reverse primer	GGTTCTCCTTGTGTGCTCAATCT	24	61.28	45.83	6.00	2.00

Products on target templates

>[NW_018084968.1](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc unplaced genomic scaffold, Sscrofa11.1 Contig1878

```
product length = 3222
Forward primer 1      ATTTGTGTCAGAGGCCCTGAAGGAG  23
Template        1956270 ..... 1956292

Reverse primer 1      GGTTCTCCTTGTGTGCTCAATCT  24
Template        1959491 ..... 1959468
```

Obrázek 36 BLAST vyhodnocení dvojice primerů G

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CAGGAGGCCATCCCCTACAC	20	61.70	65.00	6.00	0.00
Reverse primer	CGACATTGGGGAAAGTGAAGAAG	23	59.81	47.83	3.00	0.00

Products on target templates

>[NW_018084968.1](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc unplaced genomic scaffold, Sscrofa11.1 Contig1878

```
product length = 213
Forward primer 1      CAGGAGGCCATCCCCTACAC  20
Template        1959581 ..... 1959600

Reverse primer 1      CGACATTGGGGAAAGTGAAGAAG  23
Template        1959793 ..... 1959771
```

Obrázek 37 BLAST vyhodnocení dvojice primerů H

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATTCAGCTGTTTGAGGAGGTGCAG	24	63.38	50.00	6.00	2.00
Reverse primer	CACCAGAAAGCTGAGTGCAGGA	23	62.37	52.17	5.00	3.00

Products on target templates

>[NW_018084968.1](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc unplaced genomic scaffold, Sscrofa11.1 Contig1878

```
product length = 865
Forward primer 1      ATTCAGCTGTTTGAGGAGGTGCAG  24
Template        1962328 T.G..... 1962351

Reverse primer 1      CACCAGAAAGCTGAGTGCAGGA  23
Template        1963192 ..... 1963170
```

Obrázek 38 BLAST vyhodnocení dvojice primerů I

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCAGACTGTCTCCAAGGATCAGAG	24	61.95	54.17	7.00	2.00
Reverse primer	TGGCTCATGATAAGGCTGTTGTTT	24	61.05	41.67	6.00	0.00

Products on target templates

>[NW_018084968.1](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc unplaced genomic scaffold, Sscrofa11.1 Contig1878

```
product length = 181
Forward primer 1      CCAGACTGTCTCCAAGGATCAGAG  24
Template        1953062 ..... 1953085

Reverse primer 1      TGGCTCATGATAAGGCTGTTGTTT  24
Template        1953242 ..... 1953219
```

Obrázek 39 BLAST vyhodnocení dvojice primerů J

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATTGCCATGAACTGGTGTAGGT	24	62.58	45.83	4.00	0.00
Reverse primer	GGGAGCCTAAATGACAAAACGAAC	24	60.62	45.83	3.00	0.00

Products on target templates

>[NW_018084968.1](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc unplaced genomic scaffold, Sscrofa11.1 Contig1878

```
product length = 198
Forward primer 1      ATTGCCATGAACTGGTGTAGGT  24
Template        1953703 ..... 1953726

Reverse primer 1      GGGAGCCTAAATGACAAAACGAAC  24
Template        1953900 ..... 1953877
```

Obrázek 40 BLAST vyhodnocení dvojice primerů K

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACTGAAAGCCAAATCAGGTGAGAA	24	60.69	41.67	4.00	0.00
Reverse primer	CTTTTCTTCTGTGGTGGGCTTCTT	24	61.47	45.83	2.00	0.00

Products on target templates

>[NC_010443.5](#) Sus scrofa isolate TJ Tabasco breed Duroc chromosome 1, Sscrofa11.1

```
product length = 199
Forward primer 1      ACTGAAAGCCAAATCAGGTGAGAA  24
Template        164476571 ..... 164476548

Reverse primer 1      CTTTCTTCTGTGGTGGGCTTCTT  24
Template        164476373 ..... 164476396
```

Obrázek 41 BLAST vyhodnocení dvojice primerů pro RPL4

4.6 Amplifikace vybraných oblastí cDNA genu *HMOX1*

Byla provedena amplifikace v termocyklu LightCycler Nano Instrument (Roche) (viz Obr.42). Vzorky byly připraveny pomocí kitu FastStart Essential DNA Green Master (Roche).

Komponenty tohoto kitu jsou FastStart SYBR Green Master, 2x koncentrovaný master mix obsahující FastStart Taq DNA polymerázu, reakční pufr, nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) a SYBR Green I.

Vzorky byly pipetovány do stripů. Každý obsahoval 6 µl premixu (5 µl Master mix, 0,5 µl forward primer, 0,5 µl reverse primer) a 4 µl cDNA, která u tkání byla naředěna na příslušnou hodnotu 0,75ng/1µl a v případě oocytů byly použity vždy dvě koncentrace. U vzorků s 50 oocytů byla koncentrace 2,85 ng/1µl a 1,43 ng/1µl a u vzorku s 20 oocytů byla koncentrace 0,8 ng/1µl a 0,4 ng/1µl. Spolu se vzorky byl amplifikován i housekeepingový gen *RPL4* a jako negativní kontrola byla použita PCR H₂O.

U všech primerů byla vyhodnocena eficeience reakce a na základě výsledků byl pro vlastní analýzu použit primerový pár *HMOX1* C. Byl použit pro porovnání expresí v jednotlivých tkáních a pro statistické vyhodnocení.

Primerový pár A současně kontroloval čistotu izolované RNA. Protože jsou primery AF/AR navrženy přes intron genu *HMOX1*, tak v případě DNA kontaminace by se tvořil dlouhý produkt.

LightCycler® Nano Instrument Protocol

The following procedure is optimized for use with the LightCycler® Nano Instrument.

Run Editor					
Detection Format	Reaction Volume [μl]				
Settings: Intercalating Dye, Normal Quality	20				
Programs					
	Temp. [°C]	Ramp [°C/s]	Hold [s]	Acquire	Cycles
Pre-Incubation	95	4	600 ⁽²⁾	-	-
3-Step	95	5	20 ⁽¹⁾⁽³⁾	-	-
Amplification	60 primer dependent ⁽⁴⁾	4	20 ⁽¹⁾⁽³⁾	-	-
	72	4	20 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁵⁾	Yes	45
Melting	95	4	10	-	-
	65	4	60	-	-
	95	0.1	1	Yes	-

Aktivace polymerázy probíhá při teplotě 95 °C při změně teploty 4 °C/s po dobu 10 minut. Následuje 45 cyklová amplifikace ve třech krocích. První krok probíhá 20 sekund při teplotě 95 °C a změně teploty 5 °C/s. Druhý krok závisí na anelační teplotě primerů. V našem případě byla anelační teplota 64 °C při změně teploty 4 °C/s po dobu 20 sekund. Třetí krok probíhal při teplotě 72 °C při změně teploty 4 °C/s po dobu 20 sekund.



Obrázek 42 LightCycler® Nano

4.7 Sekvenační analýza amplifikovaných qRT-PCR produktů

Po amplifikaci vzorku v qRT-PCR byly vytvořeny vzorky pro detekci na gelové elektroforóze. Jeden vzorek obsahoval 10 μl qRT-PCR produktu, 8 μl H_2O a 2 μl nanášecího barviva. Následně byl nanesen do kolonek 1,5 % agarózového gelu s přidaným ethidium bromidem. Gel byl vložen do systému horizontální elektroforózy. Elektroforéza probíhala 40 minut při napětí 120 V.

4.7.1 Purifikace PCR produktů

Je potřeba pročistit vzorek od gelu, primerů a nezačleněných nukleotidů. K tomu byl použit komerční kit MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen).

1. Pomocí čistého skalpelu byla vyříznuta část gelu obsahující DNA fragment. Tento fragment byl vyříznut tak, aby obsahoval co nejmenší obsah gelu.
2. Část gelu byla zvážena a vložena do 1,5 ml zkumavky.
3. Do zkumavky se přidalo 1:1 množství Binding Buffer a směs se inkubovala při 50°C. Doba byla závislá na rychlosti rozpouštění gelu. Gel musel být zcela rozpuštěn.
4. Následně bylo napipetováno 800 μl rozpuštěného gelového roztoku do zkumavky s kolonkou a vzorek se centrifugoval 1 minutu při 12 000 RPM. Proteklá tekutina byla vylita a kolonka se vložila zpět do zkumavky.
5. Bylo přidáno 100 μl Binding Buffer na kolonku a opakovala se centrifugace a vylití tekutiny jako v kroku 4.
6. Následně bylo na kolonku napipetováno 700 μl Wash Buffer. Vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty při 12 000 RPM. Proteklá tekutina byla vylita.
7. Vzorek byl znovu centrifugován 1 minutu při 12 000 RPM, abychom získali čistý vzorek bez Wash Buffer.
8. Bylo přidáno 25 μl H_2O (pH= 8,1) na kolonku k uvolnění DNA. Vzorek se nechal stát při pokojové teplotě po dobu 2 minut a následně proběhla centrifugace vzorku 1 min při 12 000 RPM.
9. Po odebrání vázací kolonky zbývá ve zkumavce izolovaná DNA.

Takto získaná DNA byla kvantifikována pomocí NanoPhorometer podle stejného postupu jako při izolaci RNA. Přístroj byl však kalibrován 3 μl H_2O

4.7.2 Příprava sekvenační reakce

Sekvenace byla provedena pomocí kitu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit od firmy Applied Biosystems.

Byly použity následující komponenty: PCR produkt o objemu 7,5 μl a koncentraci 6,5 mg/ μl , primer F (R) o objemu 3,2 μl a koncentraci 3,2 pikomolu x 20 μl^{-1} , sekvenční pufr o objemu 4 μl a Terminator Ready Reaction mix o objemu 2 μl a koncentraci 2 μl x 20 μl^{-1} .

4.7.3 Čištění produktů sekvenční reakce

- 1) Ke vzorku bylo přidáno 2 μ l roztoku glykogenu, 2 μ l 3M octanu sodného a 50 μ l 96 % etanolu.
- 2) Vzorek byl promíchán a 15 minut v klidu při pokojové teplotě.
- 3) Centrifugace vzorku 15 minut při 13 200 RPM. Poté byl na dně ponechán vysrážený produkt a přebytečná tekutina odpipetována.
- 4) Po přidání dalších 250 μ l 70 % ethanolu byl vzorek centrifugován 15 minut při 13 200 RPM a přebytečná tekutina odpipetována. Tento krok se ještě jednou zopakoval.
- 5) Připravil se termoblok vyhřátý na 50 °C a vzorek v něm byl vysoušen po dobu 30 minut.
- 6) Ke vzorku bylo přidáno 15 μ l Hi-Di formamidu a proběhla denaturace v termocykleru C1000 (BioRad) při 95 °C po dobu 5 minut.
- 7) Vzorek byl ochlazen na teplotu 4 °C a vložen do systému kapilární elektroforézy.
- 8) Kapilární elektroforéza byla provedena pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 310 Genetic Analyser od firmy Applied Biosystems. Parametry sekvenční analýzy v kapilární elektroforéze byly následující: délka kapiláry byla 50 cm, modul SeqPOP6 (1ml) E, virtuální filtr E, doba nástřiku 30 sekund, napětí nástřiku 2,5 kV, teplota při separaci byla 50 °C, napětí separace 11,3 kV, doba separace 120 minut.

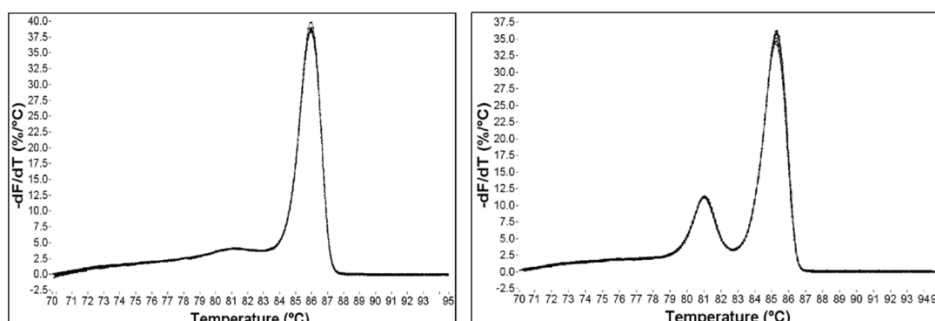
4.8 Testování specifičnosti amplifikace pomocí analýzy teploty tání T_m

Pokud se v experimentu používá SYBR Green barvivo, dá se kontrolovat, zda vznikají či nevznikají nescifické produkty a kontroluje se tím specifičnost amplifikace. Teplota tání je taková teplota, kdy jsou všechny molekuly cDNA jednovláknové a barvivo SYBR Green není nikde navázáno.

K analýze teploty tání byl použit software termocykleru LightCycler Nano od firmy Roche. Testovány byly všechny primery a tkáně u prasnice číslo 1. Amplikony byly zahřáty na 60 °C po dobu 1 minuty při rychlosti změny teploty 4 °C/s. Tato doba stačí na rozvolnění vláseňovitých struktur vytvářených sekundárně při nižší teplotě. Z teploty 60 °C se vzorky pomalu zahřívají (0,1 °C/s) na teplotu 95°C. Dalších 20 sekund se teplota 95 °C udržuje a následně teplota znovu klesá na 40°C.

Výsledkem této analýzy je tzv. melting curve. Zobrazena v grafu by měla být pouze jedna hlavní amplituda. Pokud se objeví více vrcholů tak vznikají i nescifické produkty (viz Graf 1).

Graf 1 Grafy zobrazující možné výsledky Tm analýzy. První graf zleva zobrazuje ideální případ jedné křivky, která říká, že se tvoří jen jeden specifický produkt. Druhý graf zobrazuje dvě křivky, z nichž jedna zobrazuje nespecifický produkt (Dwight et al. 2011)



4.9 Zohlednění efficiency primerů

Aby byla qRT-PCR přesnější, je nutné zohlednit efficiency vlastní reakce. Efficiency PCR je definována jako počet cílových molekul, které jsou kopírovány v jednom cyklu PCR. Pouze v ideálním případě probíhá reakce PCR dokonale, a v každém cyklu se počet molekul zdvojnásobí a reakce má vzor 2^n , kde n je počet cyklů. Účinnost reakce je však ve skutečnosti jiná, většinou snižená a v případě nepřítomnosti interferujících látek v matrici vzorku by se měla cílová DNA amplifikovat alespoň s 90% účinností.

Účinnost reakce je důležitým faktorem při kvantifikaci, jelikož při efektivitě 100 % je množství molekul DNA vzniklých z jedné molekuly po deseti cyklech 2^{10} , výsledkem je tedy 1024 molekul. Při efektivitě 90 % je počet molekul DNA vzniklých po deseti cyklech z jedné molekuly $1,9^{10}$, a výsledné množství je jen 613 molekul. Rozdíl mezi těmito hodnotami je tak významný.

4.10 Statistické zpracování výsledků

Pro statistickou analýzu byly jako stupní data použity hodnoty Ratio ΔCq , které určují rozdíl mezi relativní expresí studovaného genu *HMOX1* a housekeepingového genu *RPL4*. Ratio ΔCq bylo použito jako závisle proměnná a hodnoty počtu prasat, tkání a replikátů byly použity jako nezávisle proměnné. Ptáme se tak, zda li variabilita Ratio ΔCq je způsobena typem tkáně, prasnici nebo replikáty.

V první části statistického hodnocení bylo provedeno ověření homogenity rozptylů vybraných parametrů. Byla zvolena hladina významnosti $\alpha=0,05$ a proveden Leveneův test homogenity rozptylu pro více náhodných výběrů.

Dále byla testována normalita rozdělení vybraných hodnot pomocí Kolmogorovo-Smirnovu testu a Shaperovo-Wilkovo testu. Výsledná data jsou zobrazena ve formě histogramu a P-grafu.

Ke statistickému šetření byl použit počítačový program Dell Statistica version 13. V něm byla provedena analýza GLM-ANOVA hlavních efektů. Podrobnější vyhodnocení (post-hoc) analýzy GLM byla provedena pomocí Tukeyova HSD testu. Byly vytvořeny homogenní skupiny.

Podrobnější vyhodnocení bylo provedeno rovněž na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

5 Výsledky

5.1 Koncentrace a absorbance izolované RNA

V následujících tabulkách č. 5-10 můžeme vidět výsledné hodnoty analýzy pomocí UV spektrofotometru. Hodnoty A260/280 a A260/230 se pohybují kolem hodnoty 2. Vzhledem k těmto hodnotám lze předpokládat, že čistota izolované RNA byla dostatečná pro využití v dalších krocích výzkumu.

K izolaci totální RNA byl použit Kit Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep. Hodnoty koncentrace byly vysoké a tento kit byl vyhodnocen jako vhodný pro izolaci.

Tabulka 5 Výsledné hodnoty koncentrace a absorbance Prasnice 1 Biologický replikát A

Prasnice 1 Biologický replikát α	Koncentrace RNA ng/ μ l	A260/280	A260/230
1AR α (plíce)	116	2,03	2,24
1BR α (játra)	254	1,89	2,21
1CR α (děloha)	114	1,99	2,09
1DR α (srdce)	51	1,80	1,98
1ER α (slezina)	78	1,97	1,87
1FR α (vaječník)	111	2,00	2,15

Tabulka 6 Výsledné hodnoty koncentrace a absorbance Prasnice 2 Biologický replikát A

Prasnice 2 Biologický replikát α	Koncentrace RNA ng/ μ l	A260/280	A260/230
2AR α (plíce)	67	2,03	1,09
2BR α (játra)	195	1,93	1,09
2CR α (děloha)	-	-	-
2DR α (srdce)	39	3	0,08
2ER α (slezina)	83	2,02	1,88
2FR α (vaječník)	61	2,02	2,16

Tabulka 7 Výsledné hodnoty koncentrace a absorbance Prasnice 3 Biologický replikát A

Prasnice 3 Biologický replikát α	Koncentrace RNA ng/ μ l	A260/280	A260/230
3AR α (plíce)	128	2,07	2,05
3BR α (játra)	157	1,98	1,89
3CR α (děloha)	-	-	-
3DR α (srdce)	42	1,93	1,99
3ER α (slezina)	61,20	2,05	2,00
3FR α (vaječník)	105	2,02	2,16

Tabulka 8 Výsledné hodnoty koncentrace a absorbance Prasnice 1 Biologický replikát B

Prasnice 1 Biologický replikát β	Koncentrace RNA ng/ μ l	A260/280	A260/230
1AR β (plíce)	131	1,91	1,96
1BR β (játra)	210	1,97	2,00
1CR β (děloha)	197	1,86	1,93
1DR β (srdce)	47	1,95	1,81
1ER β (slezina)	85	2,01	1,78
1FR β (vaječník)	118	1,96	1,91

Tabulka 9 Výsledné hodnoty koncentrace a absorbance Prasnice 2 Biologický replikát B

Prasnice 2 Biologický replikát β	Koncentrace RNA ng/μl	A260/280	A260/230
2ARβ (plíce)	81	1,86	1,90
2BRβ (játra)	213	1,88	1,89
2CRβ (děloha)	-	-	-
2DRβ (srdce)	46	1,93	2,05
2ERβ (slezina)	67	2,04	2,04
2FRβ (vaječník)	141	1,86	1,98

Tabulka 10 Výsledné hodnoty koncentrace a absorbance Prasnice 3 Biologický replikát B

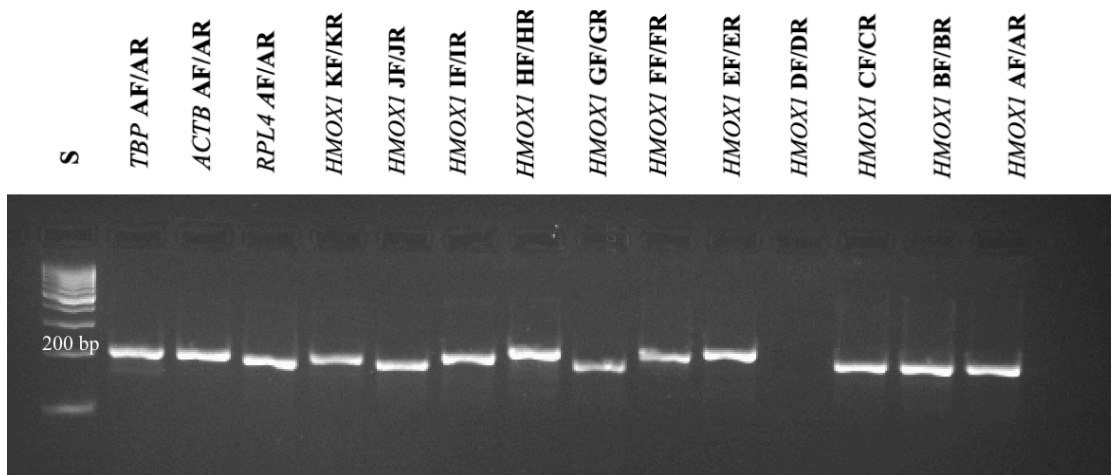
Prasnice 3 Biologický replikát β	Koncentrace RNA ng/μl	A260/280	A260/230
3ARβ (plíce)	104	1,99	2,04
3BRβ (játra)	163	1,78	1,89
3CRβ (děloha)	-	-	-
3DRβ (srdce)	58	2,07	1,96
3ERβ (slezina)	88	1,89	1,97
3FRβ (vaječník)	93	1,85	2,08

5.2 Testování navržených primerů

Testovány byly všechny typy navržených primerů genu *HMOX1* A-K a primery tří housekeepingových genů *TBP*, *ACTB* a *RPL4* na všech tkáních prasnice č. 1. Do výsledků byly vybrány dva elektroforeogramy, které nejlépe charakterizovaly průběh elektroforézy, tkáň A a B. Ostatní elektroforeogramy měly podobný průběh.

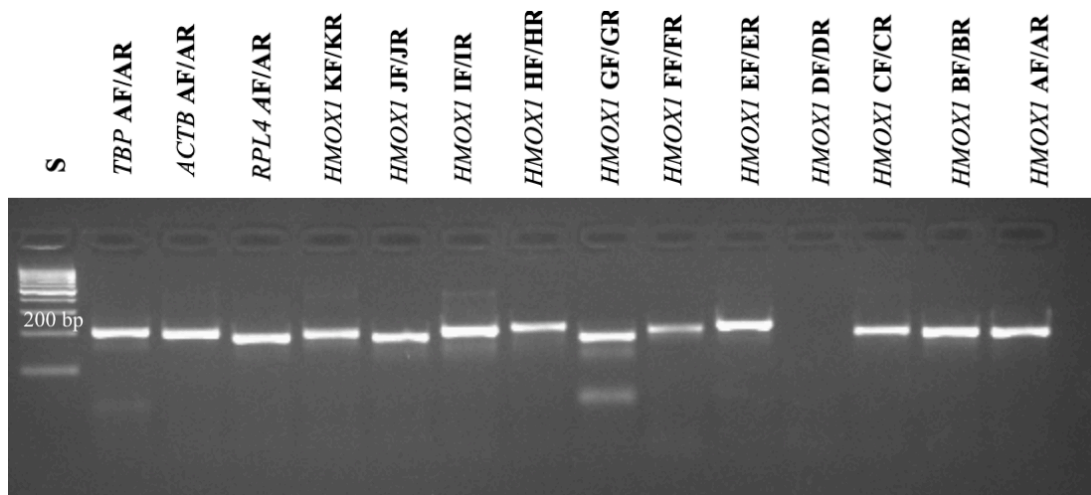
Podle elektroforetických výsledků na elektroforeogramech 43 a 44 byly vybrány nejvhodnější primery k samotné qRT-PCR. Kromě primerů *HMOX1* DF/DR tvořily všechny ostatní páry příslušné produkty. U některých tkání se tvořily nespecifické amplikony, například u tkáně B prasnice číslo 1, při použití primeru *HMOX1* GF/GR. Takto jsme vyhodnotili, který pár primerů bude nejvhodnější k dalšímu použití.

Vybrán byl z vizuálních parametrů pár primerů *HMOX1* CF/CR a *RPL4* AF/AR, které ani v jedné tkáni netvořily nespecifický produkt a byly vidět jasně zřetelné proužky (bendy) dané velikosti.



S – Thermo Scientific™ GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder

Obrázek 43 Elektroforéza 20 ng PCR produktů na 3% agarózovém gelu v 1xTBE pufru, tkáň A u prasnice číslo 1



S – Thermo Scientific™ GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder

Obrázek 44 Elektroforéza 20ng PCR produktů na 3% agarózovém gelu v 1xTBE pufru, tkáň B u prasnice číslo 1

5.3 Řešení problému s párem primerů *HMOX1* DF/DR

V předešlém výsledku bylo zjištěno, že pár primerů *HMOX1* DF/DR neamplifikoval při PCR reakci. Bylo tedy zkoumáno, z jakého důvodu tento problém nastal.

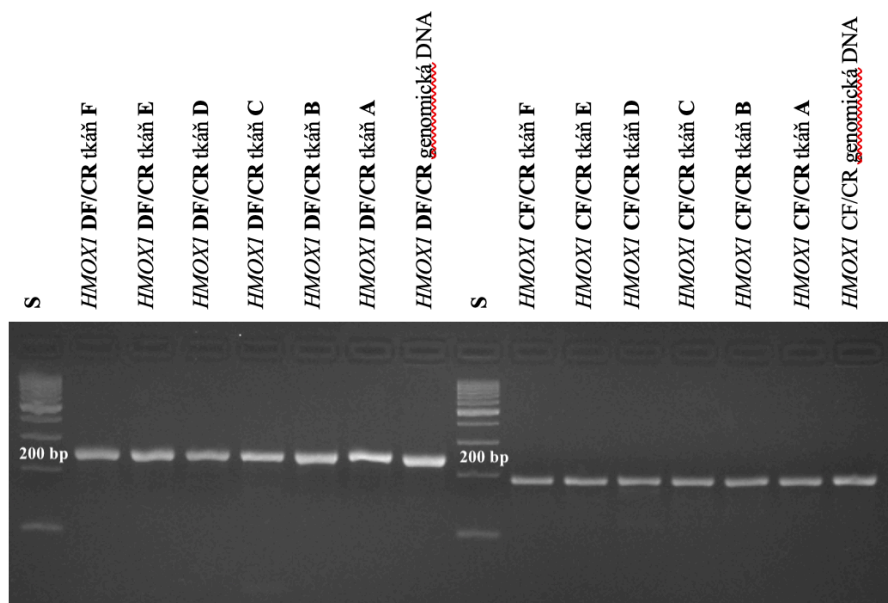
Byla vytvořena kombinace správně pracujícího páru primerů *HMOX1* CF/CR s párem primerů *HMOX1* DF/DR. Vznikly tak tyto kombinace: *HMOX1* CF/DR a *HMOX1* DF/CR. Dvojice primerů *HMOX1* DF/CR v celogenomové DNA v cDNA jednotlivých tkání u prasnice č. 1 amplifikovala příslušný produkt o velikosti 219, zatímco primerový pár *HMOX1* CF/DR ne.

Byla tedy zkoumána sekvence reversového primeru *HMOX1* DR. Po sekvenační analýze byly objeveny bodové mutace v této oblasti genu *HMOX1*.

Byl osekvenován produkt vzniklý amplifikací cDNA pomocí páru primerů *HMOX1* DF/CR. Tento produkt byl v oblasti páru primerů *HMOX1* DF/CR homologní k originální sekvenci *HMOX1*-202 ENSSCG00000039745 z databáze Ensembl. Bylo zjištěno, že se v zde

nacházejí dvě bodové mutace (Y=C-T, K=T-G), přičemž SNP Y je v oblasti nasedání reversového primeru *HMOX1* DR. Proto nemohl tento reversový primer fungovat.

Výsledky této analýzy jsou zobrazeny níže na obrázcích 45 a 46.



S – Thermo Scientific™ GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder

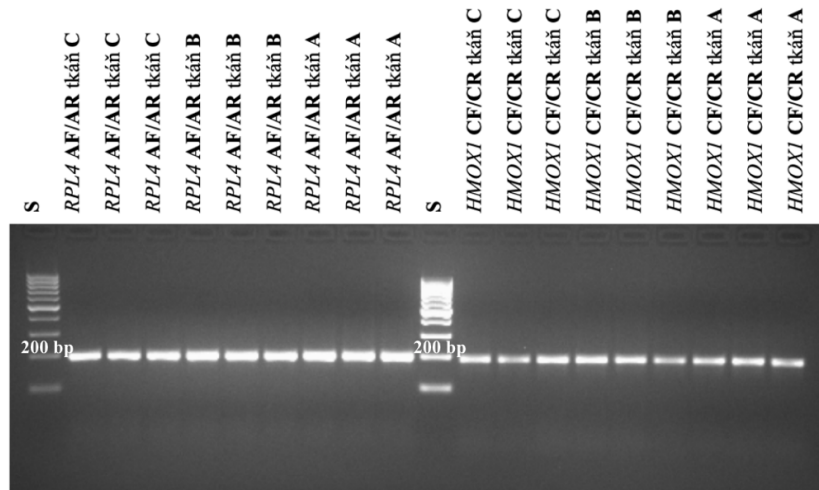
Obrázek 45 Elektroforéza genomové DNA a tkání A-F prasnice 1 na 3 % agarózovém gelu v 1xTBE pufru, primery *HMOX1* CF/CR a *HMOX1* DF/CR



Obrázek 46 Porovnání sekvence amplifikovaného úseku *HMOX1* (primerový pár DF/CR) se sekvencí *HMOX1*-202 ENSSSCG00000039745

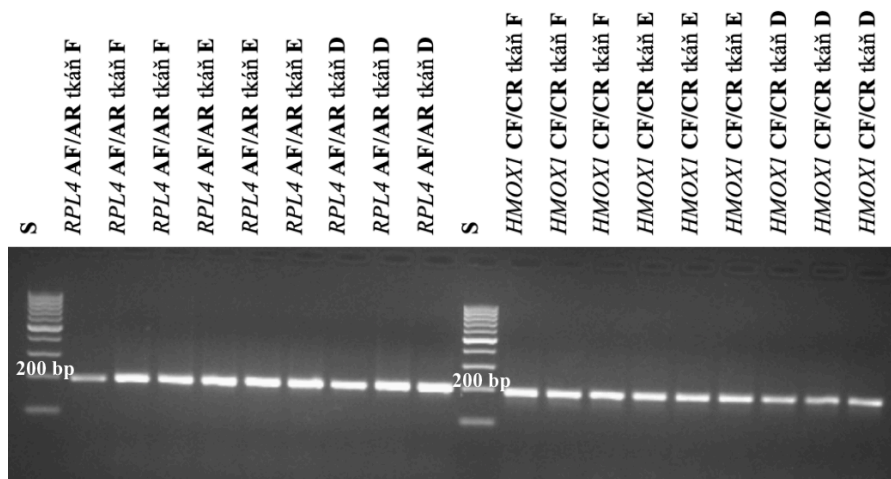
5.4 Elektroforetický test všech tkání s vybranými primery *HMOX1* CF/CR a *RPL4* AF/AR

Tímto testem jsme ověřili, zda podmínky, které jsme nastavili, jsou vhodné k přesné a intenzivní amplifikaci za tvorby specifického produktu, bez sekundárních amplikonů. Test proběhl jak u genu *HMOX1*, tak u housekeepingového genu *RPL4*. Každý biologický replikát (tkáň) byl rozdělen na 3 technické triplikáty viz Obr. 47 a 48.



S – Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

Obrázek 47 Elektroforéza tkání A, B, C (3 replikáty), použití primerů *HMOX1* CF/CR a *RPL4* AF/AR, 2,5 % agarózový gel v 1x TBE pufru, 60 minut



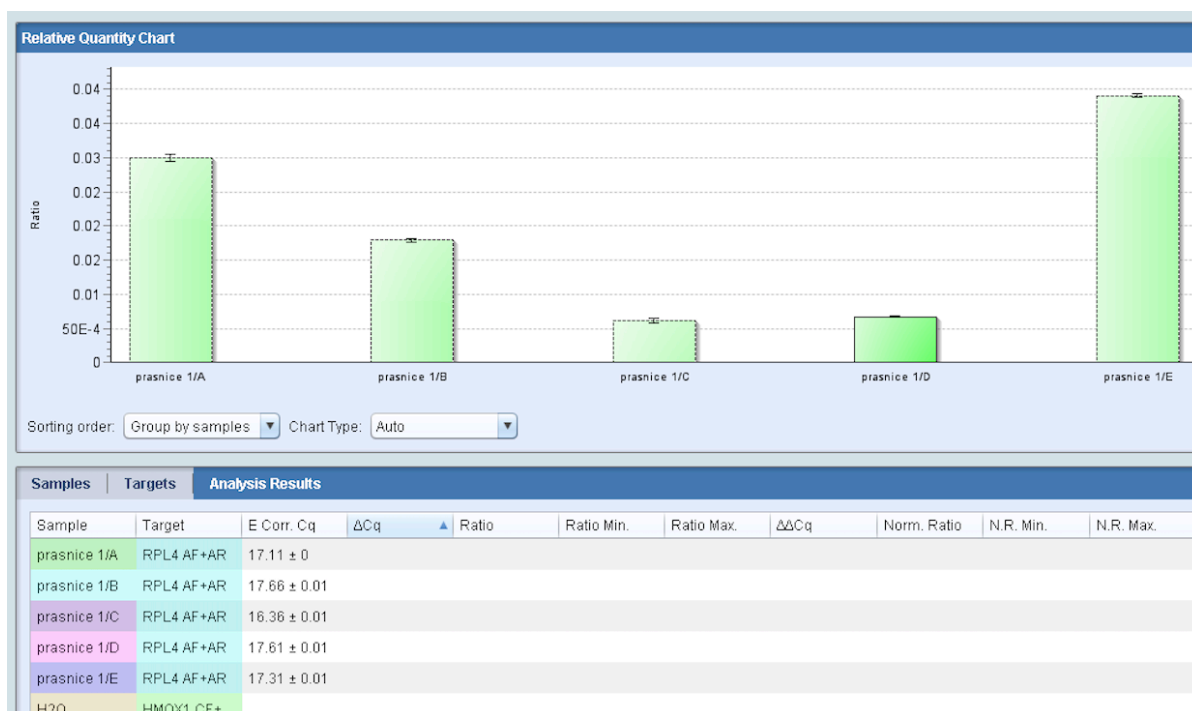
S – Thermo Scientific™ GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder

Obrázek 48 Elektroforéza tkání D, E, F (3 replikáty), použití primerů *HMOX1* CF/CR a *RPL4* AF/AR, 2,5 % agarózový gel v 1x TBE pufru, 60 minut

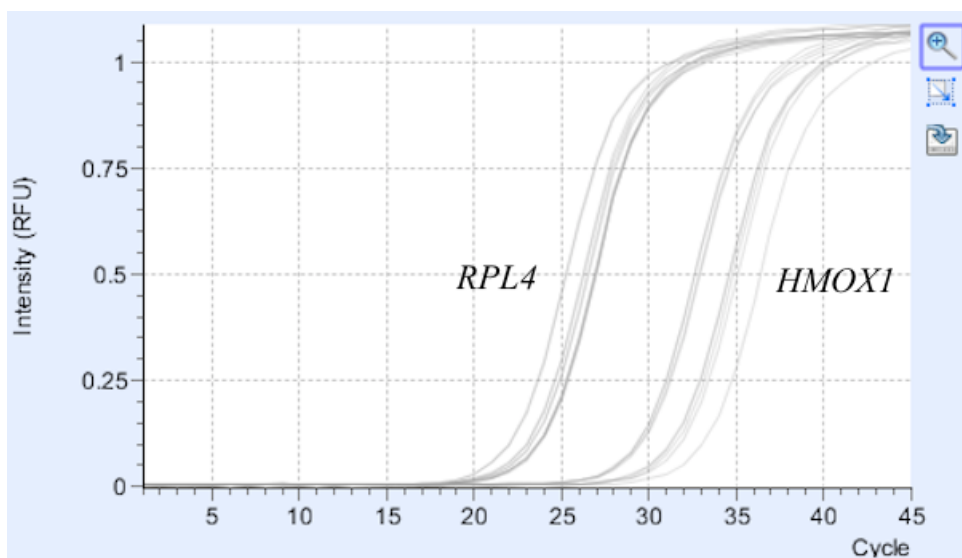
5.5 Vyhodnocení qRT-PCR

Pro relativní kvantifikaci a stanovení parametru ΔCq byl použit program LightCycler® Nano Roche. Program vypočítal parametry ΔCq . Byla vytvořena tabulka v programu excel s vypočítanými hodnotami, které byly následně využity pro statistické hodnocení (Tab.11).

Jako příklad uvádím výstup z tohoto programu, který můžeme vidět na Obr. 49. Zde zelené sloupce označují míru exprese v jednotlivých tkáních. Obr. 50 zobrazuje dva odlišné exponenciální nárůsty množství DNA u amplifikace pomocí primerů *RPL4* AF/AR a primerů *HMOX1* CF/CR. Hodnota Cq genu *RPL4* je 21 a hodnota Cq genu *HMOX1* 29. Tyto hodnoty prokazují, že gen *RPL4* jako housekeeping gen se exprimuje ve větším množství než gen *HMOX1*.



Obrázek 49 Výstup programu LightCycler® Nano Roche který vyhodnocuje hodnoty ΔCq



Obrázek 50 Průběh qRT-PCR genu *HMOX1* a housekeepingového genu *RPL4*

5.5.1 Efficiencie reakce pomocí standardní křivky

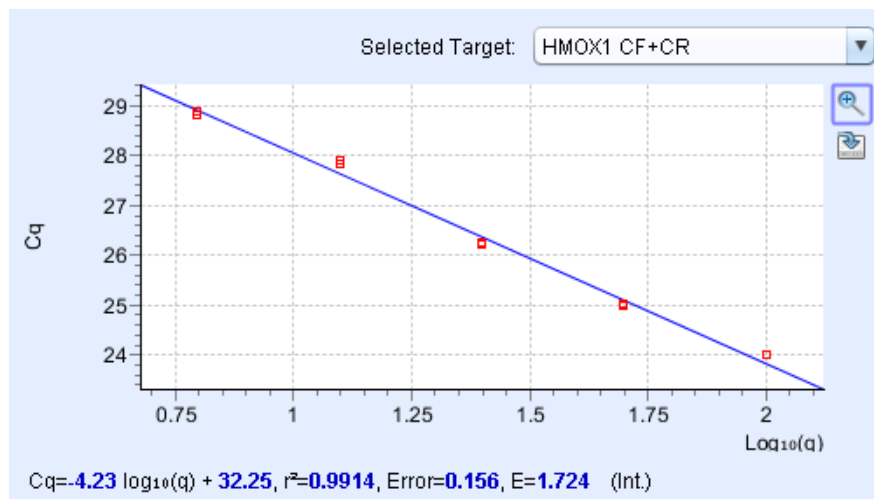
Sklon standardní křivky se běžně používá k odhadu účinnosti amplifikace qRT-PCR. Je připravena ředící řada templátu a pro každé ředění se získá hodnota C_q.

Standardní křivka se zobrazuje graficky a pokud je sklon křivky -3,32, PCR pracuje se 100% účinností. Tato efektivita během exponenciální fáze vytváří 10x více PCR produktu každých 3,32 cyklu ($\log_2 10 = 3,32$). Sklony negativnější než -3,32 označují reakce, které jsou méně než 100% účinné. Sklon pozitivnější než -3,32 může naznačovat problémy s kvalitou vzorku nebo pipetováním. Výsledné křivky genu *HMOX1* a *RPL4* můžeme vidět na grafech č. 2 a 3, přičemž sklon křivky genu *HMOX1* je -4,23 a sklon křivky genu *RPL4* je -4,33.

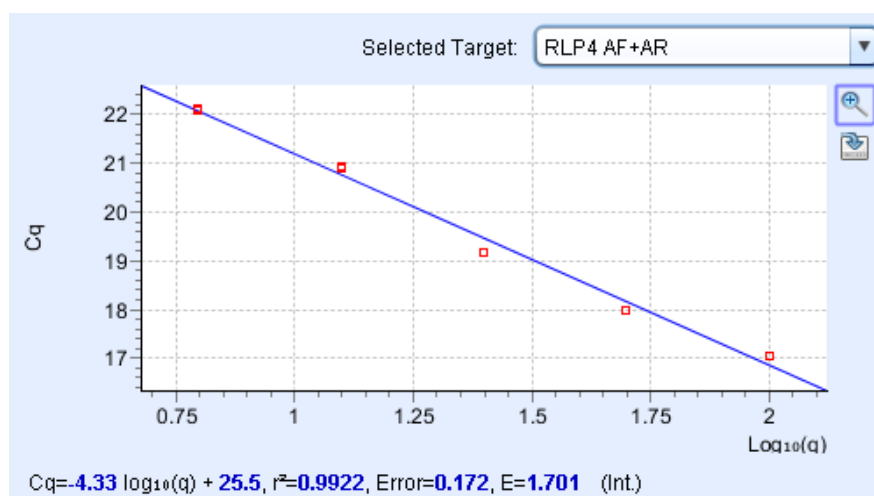
Efektivita reakce u genu *HMOX1* je $E=1,724$ a u housekeepingového genu *RPL4* $E=1,701$. Aby byla metoda relativní kvantifikace platná, musí být účinnost amplifikace cílového genu a endogenní kontroly přibližně stejná.

Výpočet pro odhad účinnosti (E) RT-PCR je $E = (10^{(-1/\text{Slope})} - 1) \times 100$.

Graf 2 Standardní křivka amplifikace cDNA genu *HMOX1* (primerový pár CF/CR)



Graf 3 Standardní křivka amplifikace cDNA genu *RPL4* (primerový pár AF/AR)

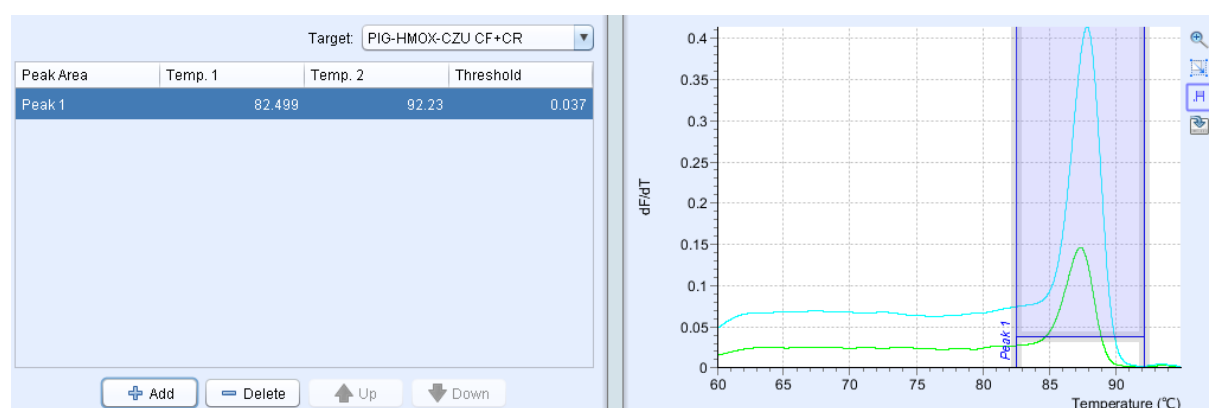


5.5.2 Specifita amplifikace pomocí vyhodnocení křivek tání

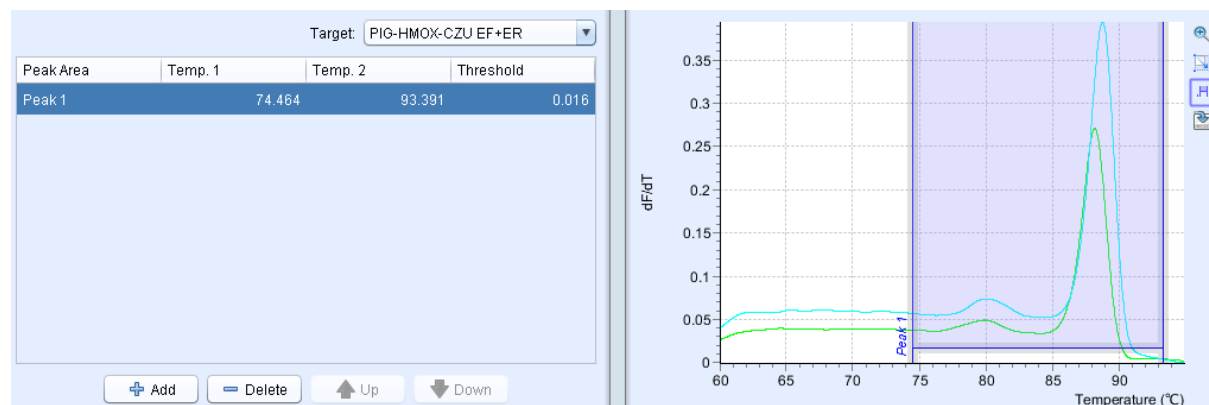
Metoda qRT-PCR analyzuje mimo jiné i specifitu amplifikace pomocí křivky tání a stanovení hodnot T_m . Analýza byla provedena u všech typů tkání a párů primerů. Na následujících obrázcích 51 a 52 jsou zobrazeny dva typy výsledných křivek. Tyto křivky jsou výstupem počítačového programu LightCycler® Nano (Roche).

Byly získány dva druhy křivek. Takové, které měly jeden ostrý pík, a tudíž se tvořil jeden specifický produkt. Druhým typem bylo zobrazení dvou píků. Tento výsledek znamenal, že pár primerů tvořil nespecifický produkt.

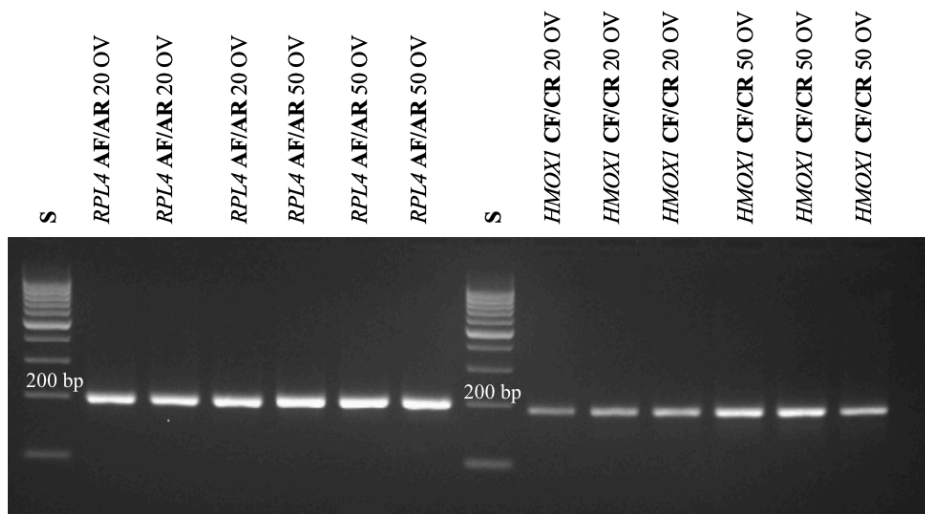
Tato analýza byla využita pro výběr vhodného primeru pro výslednou analýzu. Tento pár primerů byl *HMOX1* CF/CR, který tvořil křivku tání s jedním píkem a hodnota E se nejvíce přibližovala hodnotě E housekeepingového genu.



Obrázek 51 Křivky tání a hodnota T_m u amplikonu *HMOX1* CF/CR tkáně A, prasnice číslo 1

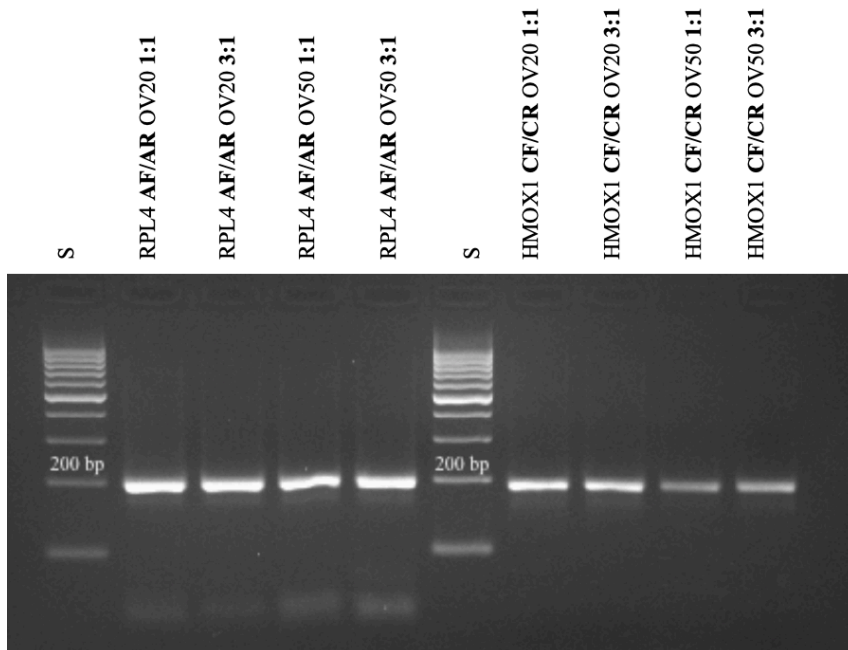


Obrázek 52 Křivky tání a hodnota T_m u amplikonu *HMOX1* EF/ER tkáně F, prasnice číslo 1



S - Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

Obrázek 54 Test přítomnosti genu HMOX1 v neřaděných oocytech ($c_{50}=5,7 \text{ ng}/1\mu\text{l}$; $c_{20}=1,6 \text{ ng}/1\mu\text{l}$)



S - Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

Obrázek 55 Elektroforeogram nařaděných vzorků oocytů ($c_{50}=2,85 \text{ ng}/1\mu\text{l}$; $c_{50}=1,43 \text{ ng}/1\mu\text{l}$; $c_{20}=0,8 \text{ ng}/1\mu\text{l}$; $c_{20}=0,4 \text{ ng}/1\mu\text{l}$)

5.8 Statistické šetření

5.8.1 Vstupní hodnoty Ratio ΔCq pro statistické analýzy

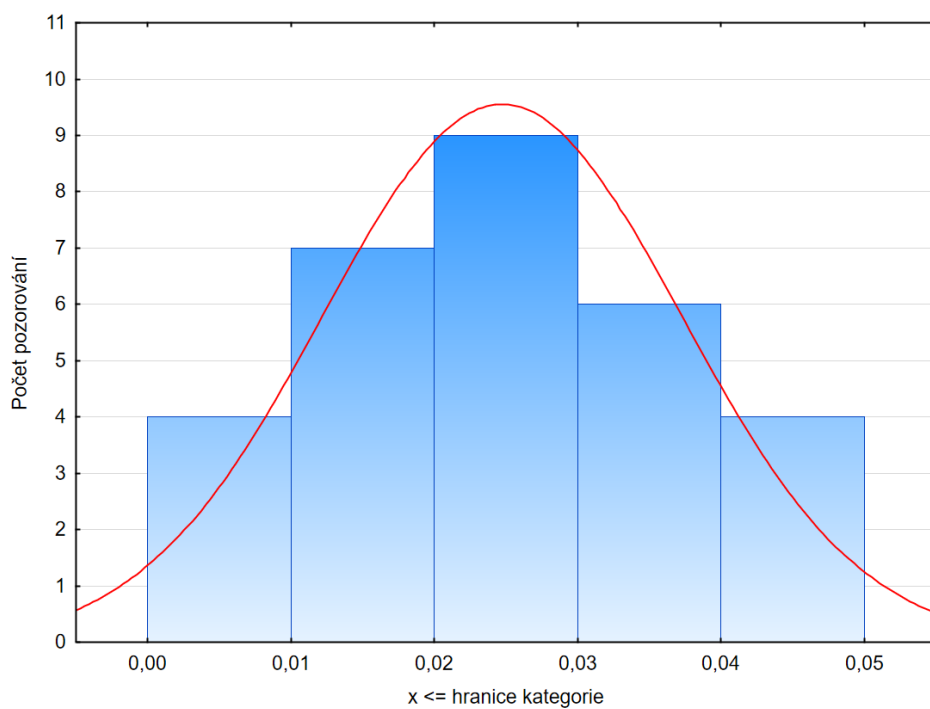
Tabulka 11 Vstupní hodnoty Ratio ΔCq

	Prasnice	Tkáň	Replikát	Ratio
1	1	A	alfa	0,03
2	1	B	alfa	0,018
3	1	D	alfa	0,007
4	1	E	alfa	0,039
5	1	F	alfa	0,015
6	2	A	alfa	0,035
7	2	B	alfa	0,025
8	2	D	alfa	0,011
9	2	E	alfa	0,049
10	2	F	alfa	0,021
11	3	A	alfa	0,032
12	3	B	alfa	0,02
13	3	D	alfa	0,005
14	3	E	alfa	0,041
15	3	F	alfa	0,021
16	1	A	beta	0,028
17	1	B	beta	0,021
18	1	D	beta	0,006
19	1	E	beta	0,04
20	1	F	beta	0,014
21	2	A	beta	0,032
22	2	B	beta	0,03
23	2	D	beta	0,013
24	2	E	beta	0,046
25	2	F	beta	0,022
26	3	A	beta	0,034
27	3	B	beta	0,022
28	3	D	beta	0,008
29	3	E	beta	0,043
30	3	F	beta	0,014

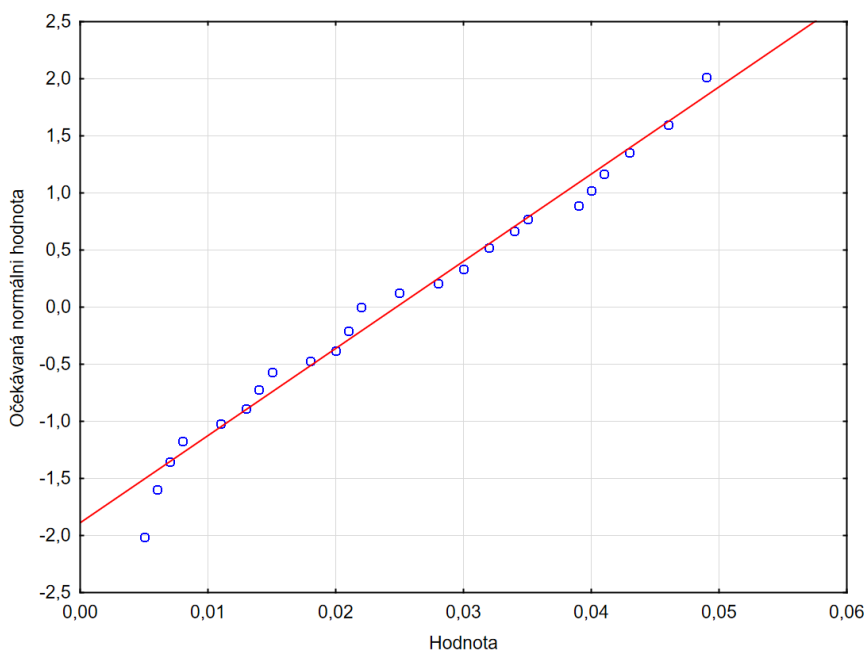
5.8.2 Test normality a test homogenity rozptylu

Kolmogorovo-Smirnovo test ($d=0,1197$; $p > 0,20$) i Shaperovo-Wilkův test ($w=0,96492$; $p=0,41093$) potvrdily, že hodnoty ΔCq vykazují normální rozdělení. Toto rozdělení můžeme vidět na grafu číslo 4. A rovněž P-graf svědčí o normalitě rozdělení. Z grafu 5 je patrné, že body P-grafu jsou umístěny převážně na proložené přímce.

Graf 4 Histogram hodnocení normality rozdělení



Graf 5 Normalita rozdělení na základě P-grafu



Leveneův test prokázal homogenitu rozptylu pro všechny hodnocené efekty (efekt prasnice $P=0,949413$; efekt tkáň $P=0,50615$; efekt replikát $P=0,994196$).

5.8.3 GLM-Anova výsledky jednorozměrných testů významnosti

V tabulce 12 jsou uvedené výsledky statistického testu Anova, kde červenou barvou jsou zvýrazněny efekty (tkáň a prasnice), které ukazovaly statisticky významný vliv na variabilitu hodnot ΔC_q na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

Pokud je hodnota p větší než 0,05, pak řídicí faktor je statisticky významný.

Tabulka 12 Výsledek testu GLM-Anova

	SČ	Stupně (volnosti)	PČ	F	p
Abs. člen	0,018352	1	0,018352	4298,229	0,000000
Prasnice	0,000226	2	0,000113	26,450	0,000001
Tkáň	0,004230	4	0,001057	247,648	0,000000
Replikát	0,000001	1	0,000001	0,125	0,727132
Chyba	0,00094	22	0,000004		

Vzhledem k tomu, že Anova prokázala jako statisticky významný efekt tkáň a prasnice, byla provedena post-hoc analýza (Tukeyův HSD test, $\alpha=0,05$), který vytvořil pět homogenních skupin pro efekt tkáň a dvě homogenní skupiny pro efekt prasnice. Tyto výsledky jsou zobrazeny v tabulce č. 13 a 14. Každá tkáň vytváří svojí homogenní skupinu, tudíž mezi všemi tkáněmi existují statisticky významné rozdíly. Prasnice číslo 1 a 3 leží ve společné homogenní skupině, tudíž mezi nimi nejsou statisticky významné rozdíly. Statisticky významný rozdíl je mezi dvojicí prasnic č. 1 a 3 a prasnicí 2, která leží samostatně v homogenní skupině.

Tabulka 13 Tukeyův HSD test pro tkáň

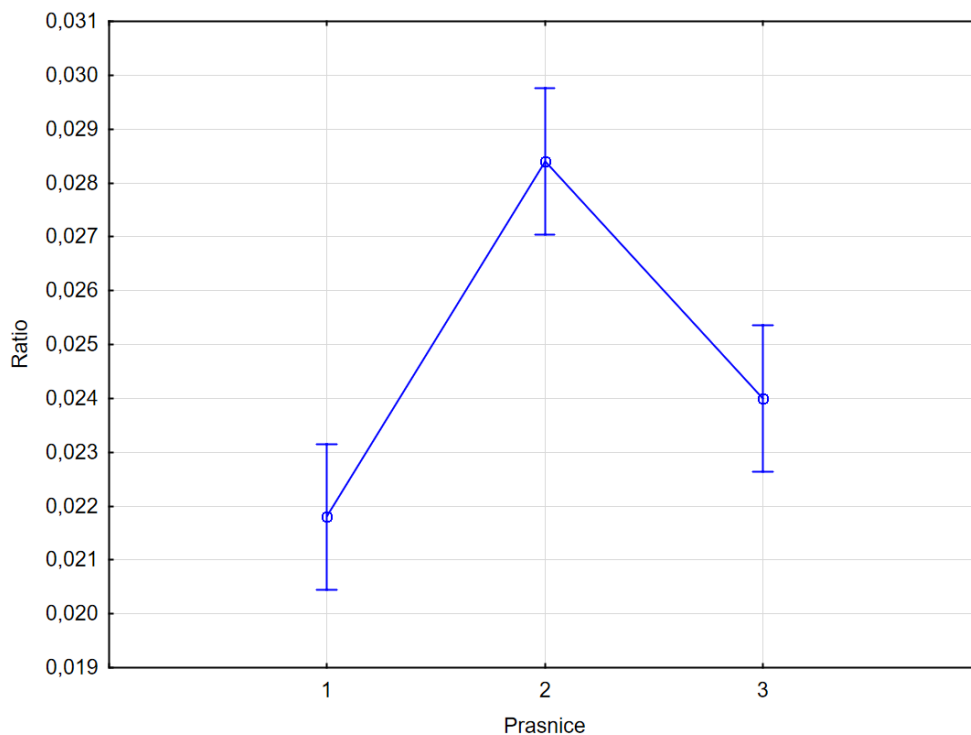
Tkáň	Ratio (Průměr)	1	2	3	4	5
D	0,008333	****				
F	0,017833		****			
B	0,022667			****		
A	0,031833				****	
E	0,043000					****

Tabulka 14 Tukeyův HSD test pro prasnice

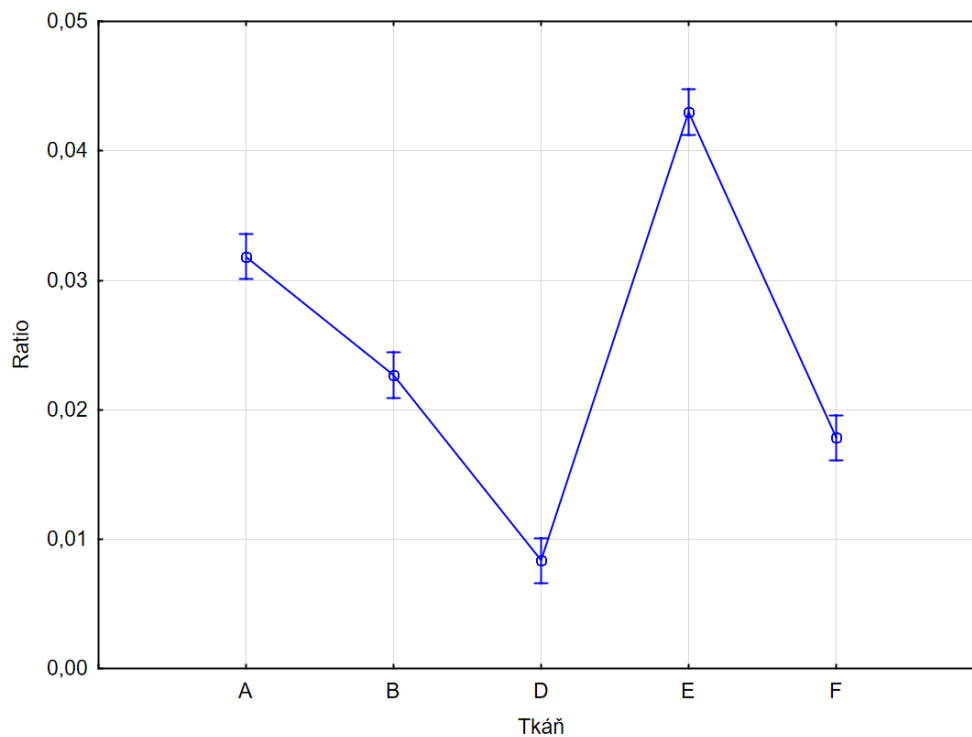
Prasnice	Ratio (Průměr)	1	2
1	0,021800	****	
3	0,024000	****	
2	0,028400		****

Dále byly porovnány rozdíly hodnot mediánů ΔC_q mezi tkáněmi, prasnicemi a replikáty. Byly vygenerovány tři grafy 6, 7, 8. V těchto grafech vertikály označují 0,95 intervaly spolehlivosti.

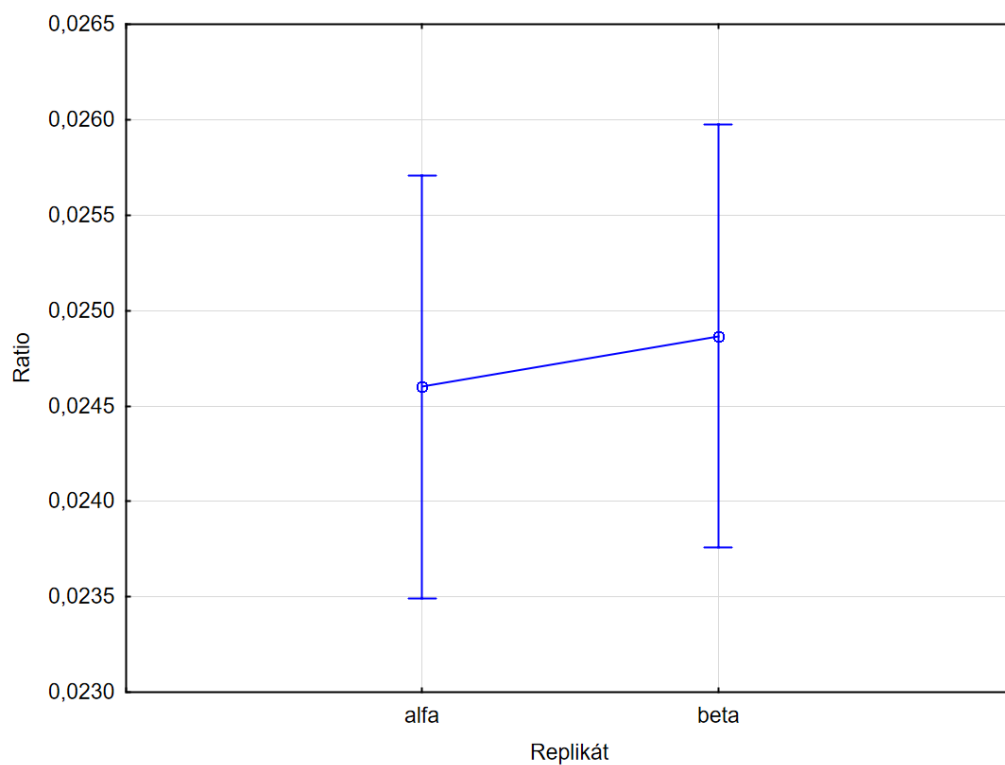
Graf 6 Krabicový graf znázorňující výsledky Anova, třídícího efektu prasnice, které jsou statisticky významným zdrojem variability ($P=0,0000$)



Graf 7 Krabicový graf znázorňující výsledek Anova třídícího efektu tkáň, které jsou statisticky významným zdrojem variability ($P=0,0000$)



Graf 8 Krabicový graf znázorňující výsledek Anova třídícího efektu replikát, které nejsou statisticky významným zdrojem variability ($P=0,72713$)



6 Diskuze

6.1 Vzorky tkání a oocyty

Gen *HMOXI* je exprimován v mnoha typech tkání těla, např. ve slezině (Fraser et al. 2011), v mozku (Chen 2014) nebo v ledvinách (Sikorski et al. 2004).

Pro tuto diplomovou práci byly získány takové druhy tkání, které bylo možné odebrat na jatcích z čerstvě poražených zvířat. Výběr byl tak přesně daný podle povolení a zákazů na příslušných jatcích. Byly však získány takové tkáně, u kterých lze sledovat rozdíly v expresi genu *HMOXI* a také tkáň, u které je předpokládána nejvyšší exprese genu *HMOXI* – slezina (Fraser et al. 2011). Dále byly získány části plic, jater, dělohy, srdce a vaječníků. Pro statistické účely byly vzorky získány od tří různých prasnic plemene bílé ušlechtilé. Toto plemeno je typické masné plemeno v České republice. Další často chovaná masná plemena u nás jsou landrase, duroc a hampshire. Tyto plemena jsou aktivně šlechtěna a používána v hospodářství podle SCHPCM - Svazu chovatelů prasat.

Ne od všech prasnic byla získána tkáň z dělohy. Tato tkáň byla alespoň využita k vyhodnocení exprese genu, ale ne ke statistickému hodnocení. Bohužel je škoda, že tato tkáň nebyla získána, protože je popsáno mnoho rolí hem oxygenázy, která má vliv na nemálo funkcí v děloze (Zenclussen et al. 2014).

Vzhledem k tomu, že *HMOXI* reguluje mnoho funkcí spojených s vývojem oocytů, ovulací, oplodněním a udržením žlutého tělíska (Zenclussen et al. 2011), byla zkoumána přítomnost a koncentrace tohoto genu v oocytech. Tyto oocyty byly připraveny daným postupem na Katedře veterinárních disciplín FAPPZ ČZU v Praze. Je možné použít i jiné protokoly extrakce oocytů z vaječníků, jako je např. protokol popsáný ve studii autory Duselis & Vrana (2007). Protokoly jsou podobné a liší se většinou jen použitá média. Vzhledem k velké citlivosti oocytů bych však ráda doporučila další výzkum, který by se zaměřil na vystavení oocytů různým mediím a vlivu těchto médií na obsah transkriptu genu *HMOXI* a úroveň exprese genu po aktivaci oocytu.

6.2 Izolace RNA a hodnocení její kvality

Před samotnou izolací musely být tkáně vhodně uloženy a zpracovány. Vhodným způsobem, jak zabránit degradaci RNA je tkáně vložit do tekutého dusíku a následně s ním pracovat v prostředí ošetřeném prostředkem pro degradaci ribonukleáz a dlouhodobě uložit v teplotách -80 °C (Brown et al. 2018). Pro ošetření povrchů a nástrojů při zpracování byl použit produkt firmy Sigma, RNase ZAP TM. Tento produkt se ukázal být vhodným pro ochranu RNA, jelikož byly získány její vysoké koncentrace. Lze použít i jiné sloučeniny jako PAXgene nebo RNAlater (Williams 2010).

K izolaci RNA mnoho firem vytváří různé kity. Pro malé vzorky tkání se používá kit RNAqueous-Micro (Ambion) nebo RNAeasy (Qiagen) (Peirson & Butler 2007). Všechny typy kitů mají podobný postup. V našem případě byl k izolaci použit kit Aldrich Gen EluteTM Mammalian Total RNA Miniprep od firmy Sigma.

Kvalita a kvantita byla zjištěna pomocí UV spektrofotometru. Hodnoty A260/280 a A260/230 byly blízké hodnotě 2,0, což naznačovalo vhodnou čistotu a koncentraci. Hodnoty

absorbance korespondují také s Koetsierem & Cantorem (2019) u kterých v experimentu hodnocení absorbancí vyšly hodnoty $A_{260/280} \sim 1,7-2,1$ a hodnoty $A_{260/230} \sim 1,93-2,07$. Po izolaci měly všechny vzorky vhodné koncentrace RNA pro následný přepis do cDNA. Tím se potvrdila vhodnost vybraného kitu a postupu při zpracování vzorků, který se ukázal jako vhodný pro izolaci RNA. Tento kit má navíc jednoduchý postup a je cenově přijatelnější než kity od jiných firem.

6.3 Reverzní transkripce

Pro syntézu cDNA lze použít mnoho různých kitů obsahujících enzym reverzní transkriptázu. Používá se High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) nebo MessageBOOSTER™ cDNA Synthesis Kit (Lucigen) (Meis & Khanna 2009). Při výběru kitů rozhoduje kromě kvality i cena. V dnešní době existuje velké množství komerčních kitů, které pracují na podobných postupech. Liší se například v použití druhů reverzních transkriptáz. Například firma ThermoFisher Scientific používá SuperScript IV a NMLV reverzní transkriptázy a firma Roche Transcript RT, která je exprimována v rekombinantní *Escherichia coli*.

V této diplomové práci byl pro syntézu cDNA použit kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis od firmy Roche. Byl vybrán kvůli jeho optimalizaci pro následnou qRT-PCR v přístroji LightCycler® Nano.

Pro následující kvantitativní real-time PCR byl použit kit FastStart Essential DNA Green Master, také od firmy Roche a termocykler LightCycler® Nano firmy Roche. Tato metoda využívá jako zdroj fluorescence SYBR Green barvivo. Tento fluorescenční substrát je nejčastěji využíván při qRT-PCR. Tento typ barviva se úspěšně využil mnoha studiích, například ve studii Reicharda et al. (2007) při indukci genu *HMOX1* pomocí transkripčního faktoru Nrf2, nebo ve studii Pottetiho et al. (2016), který popisuje expresi genu *HMOX1* po interakci Nrf2 a AKT v ledvinách.

6.4 Primery

K návrhu primerů byl použit program Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000). Tento program vyhodnotil a navrhl 11 (A-K) párů primerů pro gen *HMOX1* a 3 páry primerů pro housekeepingové geny TBP, ACTB a RPL4. Tento program využil pro vyhledání vhodných primerů pro gen *HMOX1* i Cao et al. (2015). K jeho experimentu bylo však vybráno jiné hospodářské zvíře (ovce) a vybrané primery tak byly odlišné. Program Primer3 také využil Fest et al. (2015), který zkoumal expresi genu *HMOX1* u člověka.

V našem případě k návrhu primerů byla použita sekvence transkriptu *HMOX1*-202 prasete plemene Duroc. Transkript *HMOX*-201 nebyl použit, protože se produkt translace nelišil, ale v transkriptu *HMOX1*-202 se vyskytovala delší 5'UTR oblast. Byly tedy navrženy primery J a K i do této oblasti, aby se potvrdila či vyvrátila přítomnost 5'UTR oblasti v transkribované mRNA. Oba tyto primery v této oblasti amplifikovaly, a tak se dá předpokládat, že transkript genu *HMOX1* obsahuje dlouhou 5'UTR oblast. V databázi Ensembl je tak krátký transkript zařazen nesprávně.

Elektroforeticky byly testovány všechny páry primerů u všech získaných vzorků tkání. Kromě primerového páru *HMOXI* DF/DR všechny páry primerů tvořily příslušný produkt.

Jako jediný pár, který neamplifikoval ani v jednom druhu tkáně byl *HMOXI* DF/DR. Po vytvoření kombinace primerů *HMOXI* CF/DR a *HMOXI* DF/CR a sekvenací produktu bylo zjištěno, že v oblasti nasedání reversového primeru *HMOXI* DR se vyskytuje bodová mutace (SNP) a z tohoto důvodu nemohl primer správně pracovat.

Primer však nebyl navržen špatně. Vzhledem k tomu, že primery byly navrženy dle sekvence plemena Duroc a k testování použity u plemene Bílé ušlechtilé, dalo se očekávat, že mezi plemeny budou v genomu malé změny ve formě SNP.

Po testech amplifikace pomocí křivek tání, efieience a sekvenace se vybral vhodný primer pro qRT-PCR. Byl použit primerový pár *HMOXI* CF(5'-ATGTGAATGCAACCCTGTGAATG-3');CR(5'-GGAAAGATGCCACAGACTCCTTTT-3'), který prokázal nejlepší amplifikační výsledky při testování primerů. Použitý program LightCycler® Nano automaticky vyhodnocuje efieience jednotlivých primerových párů genu *HMOXI* a housekeepingového genu *RPL4*. Hodnota byla kalkulována ze sklonu standardní křivky a v ideálním případě by měla mít hodnotu 2 (Wong & Medrano 2005).

V našem případě byla efieience primerů kolem hodnoty 1,7. Znamená to, že byla efektivita amplifikace snížena. Tento jev je však obvyklý. Hodnota 1,7 je blízko hodnotě 2, a tak příliš nesnižuje přesnost kvantifikace.

Námi vybraný primer byl pomocí programu Primer3 navržen a dále úspěšně použit i v práci Belhaj et al. (2013). Bohužel není zde uvedeno, na jakém plemeni prasete experiment proběhl a zda byly před experimentem navrženy i jiné primery.

6.5 qRT-PCR a hodnocení Ratio ΔCq

Vyhodnocení exprese *HMOXI* genu bylo provedeno pomocí hodnoty Ratio ΔCq . Pro vyhodnocení byl použit housekeepingový gen *RPL4* (ribosomální protein L4) pár primerů AF (5'-ACTGAAAGCCAAATCAGGTGAGAA3');AR(5'-CTTTTCTTCTGTGGTGGGCTTCTT-3'). Používá se nejčastěji spolu s jinými a často používanými housekeepingovými geny jako *GNB2L1* (guanin nukleotid vázající protein), *GAPDH* (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza), *ACTB* (aktin β) nebo *B2M* (β 2-mikroglobulin) (Tanaka et al. 2011; Jia et al. 2012; Caracausi et al. 2017).

Z hodnocení Ratio ΔCq u jednotlivých vzorků byl prokázán statisticky významný rozdíl v expresi genu u jednotlivých tkání a prasnic. Víme, že použítá zvířata byla stejného pohlaví, plemene a hmotnosti. Pokud bychom hodnotily pouze tyto parametry, prasnice by se od sebe statisticky nelišily. Nicméně nevíme, z jakých farem byly prasnice sváženy, jaký byl management v chovu, za jakých podmínek byly přivezeny na jatka, v jakém celkovém zdravotním stavu se nacházely a jakým dalším stresovým podmínkám byly vystaveny a jak reagoval jejich individuální tělesný systém na tyto vlivy. Existuje mnoho různých faktorů, které mohou ovlivnit tělesné procesy a stres je výkonný podnět, který v organismu způsobuje mnoho změn. Velice dobře je například popsán vliv tepelného stresu na expresi některých genů, vázaných na růst a kvalitu masa (Ma et al. 2019). Je proto náročné přesně zjistit, z jakého důvodu se v tomto experimentu prasnice číslo 2 lišila v expresi genu *HMOXI* od dalších dvou prasnic, které si byly statisticky podobné.

Vzorky tkání byly po získání vystaveny shodným podmínkám, a tak bylo možné přesně určit tkáně s vyšší a nižší expresí. Bylo potvrzeno, že nejvyšší exprese genu *HMOX1* má slezina, jako druhé v pořadí jsou plíce a následují játra, vaječník, srdce a s nejmenší hodnotou děloha.

Není překvapením, že právě ve slezině docházelo k nejvyšším hodnotám exprese genu *HMOX1*. Slezina je místo, ve kterém obvykle dochází k odstranění erytrocytů. Fagocyty zde pohlcují a ničí stárnoucí nebo poškozené červené krvinky. Kritickým stádiem při odstraňování erytrocytů je rozpad hemoglobinu a katabolismus uvolněného hemu pomocí hem oxygenázy. Gen *HMOX1* hraje ve slezině rozhodující roli v recyklaci železa a reguluje schopnost makrofágů sleziny tolerovat toxický hem uvolňovaný během clearance erytrocytů (Fraser et al. 2015).

Plíce se vyvinuly, aby sloužily k extrakci kyslíku ze vzduchu a k odstranění plynného odpadu z těla. Je potřeba obrovské množství kyslíku k udržení základní energetické hladiny potřebné pro přežití (Alvarado & Arce 2016). Plíce jsou nepřetržitě vystaveny vnějšímu prostředí a jsou náchylné na poškození toxiny z prostředí nebo na kontakt s četnými mikroby, včetně patogenů. Pro zvládnutí těchto vnějších podnětů musí být plíce schopny vyčistit různé částice, provádět imunitní / zánětlivé reakce, regulovat buněčný obrat a usnadnit správnou opravu po poškození, aniž by narušily absorpci kyslíku (Miller & Spence 2017). Hem oxygenáza-1 spolu s katalázou a superoxiddismutázou (SOD) jsou primárními antioxidanty v plicích (Tanaka et al. 2011). Je proto možné, že zvýšená exprese *HMOX1* v plicích je spojena se zvýšeným stresem prasníc před porážkou. Studie, které popisují funkci hem oxygenázy v plicích se však soustředí na expresi tohoto genu v plicích u člověka, které jsou poškozené či prochází onemocněním, ale také se mnoho studií zabývá spojením genu *HMOX1* do rakoviny plic (Podkalicka et al. 2018; Chen et al. 2019).

Expresa *HMOX1* byla detekována v játrech. Gen je exprimován v nízkých až nedetekovatelných hladinách v hepatocytech a je exprimován hlavně v Kupfferových buňkách za bazálních podmínek. *HMOX1* však podléhá rychlé transkripční aktivaci jak v Kupfferových buňkách, tak v hepatocytech v reakci na škodlivé podněty (Origassa & Camara 2013). Ale v játrech v menší míře také dochází k degradaci hemu (Müllebnner et al. 2015). Stanovení úlohy, kterou hraje HO-1 v regulačních mechanismech se v posledních letech stává stále důležitější, protože se ukázalo, že jeho indukce brání zánětu střeva a jater způsobené etanolem a také v prevenci oxidačního poškození hepatocytů (Brockmann et al. 2005; Immenschuh et al. 2010; Arredondo et al. 2011). Vzhledem k tomu, že v játrech dochází k degradaci hemu, je to možné vysvětlení zvýšené exprese genu *HMOX1* na rozdíl od dalších tkání.

Tkáň z vaječníku také prokázala zvýšenou hodnotu exprese genu *HMOX1*. Lze to vysvětlit tím, že *HMOX1* má zde své speciální funkce, které mají vliv na ovulaci a udržení žlutého tělíska (Zenclussen et al. 2011). Přítomnost hem oxygenázy ve vaječníku také může mít určitý vliv na produkci ovariálních steroidů přes stimulační účinky endogenního CO (Alexandreaanu & Lawson 2003).

HO-1 je enzym nezbytný pro normální funkci srdce. V normálních podmínkách se exprimuje v bazálním množství, ale *HMOX1* je exprimován v kardiomyocytech pod oxidačním stresem a exprese reaguje na oxidační signály vytvořené patologickými jevy, jako je např. IR (ischemicko-reperfúzní poškození). Lokální HO-1 je dostatečný k zajištění ochrany proti IR poškození modulací intracelulárních událostí a nadměrně exprimovaný *HMOX1* v kardiomyocytech je schopný se vypořádat s nadměrným hemem uvolněným během buněčné

smrti a může tak tlumit prozánětlivé procesy (Soares et al. 2004; Otterbein et al. 2016). HO-1 a jeho produkty mohou také poskytnout ochranu před cévním poškozením a zánětem a významně přispívají k neoangiogenezi a neovaskularizaci (Duckers et al. 2001; Lin et al. 2013; Calay & Mason 2014; Florczyk et al. 2014).

Exprese v děloze byla vyhodnocena jako nejnižší. Avšak tento závěr nemusí být přesný vzhledem k tomu, že se tato tkáň získala pouze z jednoho jedince a neexistuje vhodné srovnání. Nicméně HO-1 v děloze působí při několika klíčových událostech. Pozitivně ovlivňuje implantaci, placentaci a zajišťuje růst a přežití plodu (Zenclussen et al. 2014; Ozen et al. 2015; Zenclussen et al. 2015; Němeček et al. 2017).

Sebeochrana je základní zásadou, kterou projevují všechny organismy a je nejvíce rozpoznatelná, když je organismus konfrontován různými hrozbami přežití. Tento koncept také platí na nejzákladnější buněčné úrovni, kde buňka koordinuje řadu reakcí, které se vyvinuly, aby zajistily nejlepší šanci na obranu a přežití. Schopnost buněk a tkání vytvářet adaptivní reakci na stres, která je v konečném důsledku zodpovědná za ochranu před poškozením a obnovení homeostázy, je silnou vnitřní strategií, která závisí na indukci několika prospěšných obranných systémů. Mezi nimi hraje bílkovina hem oxygenáza významnou roli. Byla rozpoznána v různých orgánech a tkáních, jakož i v různých patologických stavech (Alam et al. 2000; Jozkowicz et al. 2003; Alam & Cook 2005; True et al. 2007; Loboda et al. 2008; Dunn et al. 2004).

Hlavní funkcí HO-1 je degradovat hem a generovat oxid uhelnatý, železo, které je uloženo ve feritinu a biliverdin. Tyto produkty vykazují signalizační a cytoprotektivní aktivity, které zmírňují apoptózu, zánět a vykazují antioxidační a imunomodulační funkce. Je pozoruhodné, že tak široký rozsah a významný soubor pozitivních účinků může být spojen s jedinou enzymatickou reakcí a že tyto vlastnosti byly postupně odhaleny, počínaje mylným předpokladem, že metabolity hem oxygenázy jsou v podstatě pouze odpadní produkty (Kappas et al. 1958; Coburu et al. 1966; Tenhunen et al. 1968; Tenhunen et al. 1969).

Kromě produktů odvozených od HO-1 je úlohou tohoto enzymu působit proti oxidačnímu poškození tkáně vyvolané volným hemem. To je zvláště důležité, když dojde k poškození buněk a buňky najednou uvolní velké množství hemu. Jedním výjimečným problémem, který zůstává nevyřešený v oblasti hem oxygenázy je zdroj hemu, který podporuje jeho enzymatickou aktivitu a generuje základní cytoprotektivní produkty. Je známo, že zásoba intracelulárního hemu je přísně regulována přesnou rovnováhou mezi mírami biosyntézy, katabolismu a exportu hemu (Otterbein et al. 2016). Nebyly však provedeny žádné studie, které by určily zdroj hemu používaného hem oxygenázou buď během fyziologických podmínek nebo když je HO-1 indukován v chorobných stavech.

Přijatelné je pro všechny vědce pracující v této oblasti, že za normálních podmínek je hem získáván z obratu proteinu, ke kterému dochází během typického opotřebení buňky. Je však stále nezodpovězeno mnoho otázek týkajících se problematiky funkce hem oxygenázy, jejího substrátu hemu a produktů katabolismu hemu. Je zřejmé, že je nutné vyvinout nové experimentální přístupy, které budou schopné detailně ověřit všechny funkce genu *HMOX1* a jeho produktu, hem oxygenázy.

7 Závěr

Literární přehled diplomové práce byl zaměřen na charakteristiku prasete domácího, jeho domestikaci a strukturu genomu. Dále byl detailně popsán gen *HMOX1*, včetně způsobu jeho regulace a charakterizován protein hem oxygenáza, který je finálním produktem přepisu tohoto genu.

Jsou zde popsány základní metody využívané ke stanovení exprese genů a detailněji popsána metoda využívaná v této diplomové práci, qRT-PCR. V experimentální části byly použité tkáně prasete domácího a plemene Bílé ušlechtilé, které se nejčastěji chová pro masné účely a z tohoto pohledu je toto plemeno vhodné pro získání různých tkání, a to přímo u poražených zvířat na jatkách. Současně lze získat i vaječníky v optimálním stupni vývoje vhodným pro izolaci oocytů.

Vlastní závěry diplomové práce mohou formulovat jako odpovědi na vědecké hypotézy, které byly formulovány na začátku řešení experimentu:

- 1) Během řešení diplomové práce byl navržen molekulární marker vhodný pro stanovení relativní exprese genu *HMOX1*, který je založený na porovnání kvantit ampliconu lokalizovaného v exonu 6 cDNA s kvantitou ampliconu referenčního genu *RPL4*. Vlastní postup detekce relativní exprese je založen na zabudování molekulárního barviva SYBR Green při amplifikaci. Experimentálně bylo potvrzeno, že navržená metoda extrakce celkové RNA, její přepis do cDNA a následná qRT-PCR byla dostatečně citlivá a reprodukovatelná. A to i přes skutečnost, že gen *HMOX1* je charakteristický bazální expresí. První vědecká hypotéza byla tedy potvrzena.
- 2) Statistická analýza (vícefaktorová ANOVA) potvrdila, že efekty ovlivňující variabilitu hodnot ΔCq je efekt tkáně a prasnice. Tento statisticky významný výsledek potvrdil platnost druhé vědecké hypotézy, která předpokládá různou úroveň exprese genu v odlišných tkáních. Tato hypotéza předpokládala, že k nejvyšší expresi by mělo docházet v místě degradace metaloporfyrinů – ve slezině. Provedené experimenty tuto hypotézu jednoznačně potvrdily, u všech analyzovaných jedinců i biologických replikátů slezina představovala tkáň s nejvyšší úrovní exprese genu *HMOX1*. Statistická analýza nepotvrdila statisticky významný vliv efektu biologický replikát. Tyto výsledky svědčí o tom, že metoda je velice dobře replikovatelná a současně rozdíl v expresi mezi prasnicemi mohly být způsobeny konkrétním fyziologickým stavem tkání jednotlivých prasnic při porážce, popřípadě v průběhu odběru a skladování vzorků.
- 3) Třetí hypotéza předpokládala přítomnost mRNA pro gen *HMOX1* v oocytech, které jsou obecně považovány za transkripčně neaktivní. Navržená metoda relativní kvantifikace mRNA genu *HMOX1* se ukázala být citlivá a byla schopná jednoznačně detekovat tuto mRNA ve vzorcích odpovídajících 20 a 50 oocytům. Logicky bylo vyšší relativní množství této mRNA detekováno v izolátu získaném z 50 oocytů. Třetí hypotéza byla tudíž potvrzena.

Experimentální část diplomové práce byla pilotní studií exprese genu *HMOX1* u prasete, provedená na Katedře genetiky a šlechtění na FAPPZ ČZU v Praze.

Vzhledem k tomu, že dochází k neustálému vývoji nových molekulárních metod vhodných pro studium exprese genů, bych ráda doporučila pro další experimenty využít například platformu kapičkové digitální PCR, popřípadě kombinovat detekční metodu a hybridizaci se specifickou vnitřní sondou. Právě kapičková digitální PCR je schopná kvantifikovat přítomnost izolované mRNA na úrovni absolutní kvantifikace, kdy se počet molekul mRNA výrazně přesněji kvantifikuje.

Domnívám se rovněž, že z hlediska populační genetiky by bylo vhodné aplikovat mnou optimalizovaný metodický protokol na větší počet jedinců, další plemena nebo oocyty izolované a kultivované jinými způsoby či vystavenými modelovým stresovým faktorům.

8 Literatura

- Abdalla MY, Ahmad IM, Switzer B, Britigan BE. 2015. Induction of heme oxygenase-1 contributes to survival of *Mycobacterium abscessus* in human macrophages-like THP-1 cells. *Redox Biology* **4**:328–339.
- Alam J, Cook JL. 2005. Heme oxygenase-1 gene regulation: transcription factors and transduction pathways. Nova Science Publishers. New York.
- Alam J, Cook JL. 2006. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **36**:166-174.
- Alam J, Camhi S, Choi AM. 1995. Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer dependent transcription enhancer. *The Journal of Biological Chemistry* **270**:11977-11984.
- Alam J, Wicks C, Stewart D, Gong P, Touchard C, Otterbein S, Choi AM, Burow ME, Tou J. 2000. Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry* **275**:27694-27702.
- Albarella U, Dobney K, Rowley-Conwy P. 2006. The domestication of the pig (*Sus scrofa*): new challenges and approaches in documenting domestication: new genetic and archaeological paradigms. University of California Press. Berkeley.
- Alexandrescu IC, Lawson DM. 2003. Heme oxygenase in the rat ovary: immunohistochemical localization and possible role in steroidogenesis. *Experimental Biology and Medicine* **228**:59-63.
- Alexandrescu IC, Lawson DM. 2003. Heme oxygenase in the rat anterior pituitary: immunohistochemical localization and possible role in gonadotropin and prolactin secretion. *Experimental Biology and Medicine* **228**:64-69.
- Allen JW, Jackson AP, Rigden DJ, Willis AC, Ferguson SJ, Ginger ML. 2008. Order within a mosaic distribution of mitochondrial c-type cytochrome biogenesis systems. *FEBS Journal* **275**:2385–2402.
- Alvarado A, Arce I. 2016. Metabolic Functions of the Lung, Disorders and Associated Pathologies. *Journal of Clinical Medicine Research* **8**:689-700.
- Andreadi CK, Howells LM, Atherfold PA, Manson MM. 2006. Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor-kappaB, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemeoxygenase-1 by dietary polyphenols. *Molecular Pharmacology* **69**:1033–1040.

- Archibald LA, Bolund L, Churcher C, Fredholm M, Groenen MA, Harlizius B, Lee KT, Milan D, Rogers J, Rothschild MF, Uenishi H, Wang J, Schook LB. 2010. Pig genome sequence – analysis and publication strategy. *BMC Genomics* **11**:1-5.
- Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Lo Muzio L. 2017. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy. *International Journal of Molecular Medicine* **40**:271-280.
- Arredondo M, Fuentes M, Jorquera D, Candia V, Carrasco E, Leiva E, Mujica V, Hertrampf E, Perez F. 2011. Cross-talk between body iron stores and diabetes: iron stores are associated with activity and microsatellite polymorphism of the heme oxygenase and type 2 diabetes. *Biological Trace Elements Research* **143**:625–636.
- Assou S, Boumela I, Haouzi D, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S. 2011. Dynamic changes in gene expression during human early embryo development: from fundamental aspects to clinical applications. *Human Reproduction Update* **17**:272–290.
- Bainbridge SA, Smith GN. 2005. HO in pregnancy. *Free Radical Biology & Medicine* **38**:979-988.
- Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Jacob HS, Eaton JW, Balla G. 2007. Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. *Antioxidants & Redox Signaling* **9**:2119-2137.
- Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij DG, Page DC. 2006. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nature Genetics* **38**:1430–1434.
- Banerjee P, Basu A, Wegiel B, Otterbein LE, Mizumura K. 2012. Heme oxygenase-1 promotes survival of renal cancer cells through modulation of apoptosis and autophagy-regulating molecules. *The Journal of Biological Chemistry* **287**:32113–32123
- Baranano DE, Wolosker H, Bae BI, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD. 2000. A mammalian iron ATPase induced by iron. *The Journal of Biological Chemistry* **275**:15166-15173.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **99**:16093-16098.
- Belhaj A, Dewachter L, Kerbaul F, Brimiouille S, Dewacher C, Naeije R, Rondelet B. 2013. Heme oxygenase-1 and inflammation in experimental right ventricular failure on prolonged overcirculation-induced pulmonary hypertension. *PlosOne* (e69470) DOI: 10.1371/journal.pone.0069470.

- Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, Shen X, Busuttill RW, Yamashita K, Csizmadia E, Tyagi S, Otterbein LE, Brouard S, Tobiasch E, Bach FH, Kupiec-Weglinski JW, Soares MP. 2003. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *The FASEB Journal* **17**:1724-1726.
- Bernard PS, Wittwer CT. 2000. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clinical Chemistry* **46**:147-148.
- Bianconi V, Sahebkar A, Kovanen P, Bagaglia F, Ricciuti B. 2018. Endothelial and cardiac progenitor cells for cardiovascular repair: a controversial paradigm in cell therapy. *Pharmacology & Therapeutics* **181**:156–168.
- Bode AM, Dong Z. 2007. The functional contrariety of JNK. *Molecular Carcinogenesis* **46**:591-598.
- Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. 2010. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochimica et Biophysica Acta* **1804**:463-475.
- Bologna J, Jorizzo J, Rapini R. 2008. *Dermatology*. Elsevier. Spain.
- Bothwell TH, Charlton RW, Motulsky AG. 1995. Hemochromatosis, in the metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill. New York.
- Bowman SE, Bren KL. 2008. The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment. *Natural Product Reports* **25**:1118-1130.
- Brazil DP, Hemmings BA. 2001. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in Biochemical Sciences* **26**:657-664.
- Brockmann JG, August C, Wolters HH, Homme R, Palmes D, Baba H, Spiegel HU, Dietl KH. 2005. Sequence of reperfusion influences ischemia/reperfusion injury and primary graft function following porcine liver transplantation. *Liver Transplantation* **11**:1214–1222.
- Brown TA. 2007. *Genomes 3*. Garland Science. New York & London.
- Brown RAM, Epis MR, Horsham JL. 2018. Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all kits are created equal. *BMC Biotechnology*. Available from <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-018-0421-6> (accessed May 2020).

- Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* **29**:23-39.
- Butler JE, Sinkora M. 2007. The isolator piglet: a model for studying the development of adaptive immunity. *Immunologic Research* **39**:33-51.
- Calay D, Mason JC. 2014. The multifunctional role and therapeutic potential of HO-1 in the vascular endothelium. *Antioxidants & Redox Signaling* **20**:1789–1809.
- Cao M, Cortes M, Moore CS, Leong SY, Durosier LD, Burns P, Fecteau G, Desrochers A, Auer RN, Barreiro LB, Antel JP, Frasch MG. 2015. Fetal microglial phenotype in vitro carries memory of prior in vivo exposure to inflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**:1-17.
- Caracausi M, Piovesan A, Antonaros F, Strippoli P, Vitale L, Pelleri MC. 2017. Systematic identification of human housekeeping genes possibly useful as references in gene expression studies. *Molecular Medicine Reports* **16**:2397-2410.
- Carey MF, Peterson CL, Smale ST. 2013. The RNase protection assay. *Cold Spring Harbor Protocols* **3**:276-285.
- Cargnello M, Roux PP. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **75**:50-83.
- Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. 2000. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochemical Journal* **3**:615-619.
- Coburn RF, Williams WJ, Kahn SB. 1966. Endogenous carbon monoxide production in patients with hemolytic anemia. *The Journal of Clinical Investigation* **45**:460-468.
- Collinson EJ, Wimmer-Kleikamp S, Gerega SK, Yang YH, Parish CR, Dawes IW, Stocker R. The yeast homolog of heme oxygenase-1 affords cellular antioxidant protection via the transcriptional regulation of known antioxidant genes. *The Journal of Biological Chemistry* **286**:2205–2214.
- Cook-Mills JM, Deem TL. 2005. Active participation of endothelial cells in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* **77**:487-495.
- Cornejo J, Willows RD, Beale SI. 1998. Phytobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Plant Journal* **15**:99–107.

- Costa PN, McCarthy A, Prudencio P, Greer C, Guilgur GL, Becker JD, Secombe J, Rangan P, Martinho GR. 2016. Early programming of the oocyte epigenome temporally controls late prophase I transcription and chromatin remodeling. *Nature Communications* (e12331) DOI: 10.1038/ncomms123331.
- Crescenzi M, Seto M, Herzig GP, Griffith RC, Korsmeyer SJ. 1988. Thermostable DNA polymerase chain amplification of t(14:18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. *PNAS* **85**:4869-4873.
- Cuadrado A, Nebreda AR. 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemistry Journal* **429**:403-417.
- Cuenda A, Rousseau S. 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1773**:1358-1375.
- Cui XS, Li XY, Yin XJ, Kong IK, Kang JJ, Kim NH. 2007. Maternal gene transcription in mouse oocytes: genes implicated in oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development* **53**:405-418.
- Darwin C. 1868. *The variation of animals and plants under domestication*. Cambridge University Press, London.
- Davudian S, Mansoori B, Shajari N, Mohammadi A, Baradaran B. 2016. BACH1, the master regulator gene: A novel candidate target for cancer therapy. *Gene* **15**:30-37.
- Davydov RM, Yoshida T, Ikeda-Saito M, Hoffman BM. 1999. Hydroperoxy-heme oxygenase generated by cryoreduction catalyzes the formation of α -meso-hydroxyheme as detected by EPR and ENDOR. *Journal of the American Chemical Society* **121**:10656-10657.
- De La Fuente R, Eppig JJ. 2001. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription chromatin remodeling. *Developmental Biology* **229**:224-236.
- Dennery PA. 2012. Evaluating the beneficial and detrimental effects of bile pigments in early and later life. *Frontiers in Pharmacology*. Available from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2012.00115/full> (accessed March 2020).
- Deshane J, Chen S, Caballero S, Grochot-Przeczek A, Was H, Li Calzi S, Lach R, Hock TD, Chen B, Hill-Kapturczak N, Siegal GP, Dulak J, Jozkowicz A, Grant MB, Agarwal A. 2007. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine* **204**:605-618.

- Dhanasekaran, D. N., and E. P. Reddy. 2008. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**:6245-6251.
- Dowal L, Yang W, Freeman MR, Steen H, Flaumenhaft R. 2011. Proteomic analysis of palmitoylated platelet proteins. *Blood* **118**:62–73.
- Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T. 2016. The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1864**:1372-1401.
- Duckers HJ, Boehm M, True AL, Yet SF, San H, Park JL, Clinton Webb R, Lee ME, Nabel GJ, Nabel EG. 2001. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nature Medicine* **7**:693–698.
- Dulak J, Deshane J, Jozkowicz A, Agarwal A. 2008. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation* **117**:231–241.
- Dulak J, Loboda A, Zagórska A, Józkowicz A. 2004. Complex role of heme oxygenase-1 in angiogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling* **6**:858-866.
- Carmeliet P. 2004. Manipulating angiogenesis in medicine. *Journal of Internal Medicine* **255**:538-561.
- Dunn LL, Midwinter RG, Ni J, Hamid HA, Parish CR, Stocker R. 2014. New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1. *Antioxidants and Redox Signaling* **20**:1723-1742.
- Duselis AR, Vrana PB. 2007. Retrieval of Mouse Oocytes. *Journal of Visualized Experiments*. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2535842/> (accessed March 2020).
- Dwight Z, Palais R, Wittwer CT. 2011. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics* **27**:1019-1020.
- Eferl R, Wagner EF. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* **3**:859-868.
- Ejima K, Perrella MA. 2004. Alteration in heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase-2 gene expression during endotoxemia in cyclooxygenase-2- deficient mice. *Antioxidants & Redox Signaling* **6**: 850-857.
- Elia G, Polla B, Rossi A, Santoro MG. 1999. Induction of ferritin and heat shock proteins by prostaglandin A1 in human monocytes. Evidence for transcriptional and posttranscriptional regulation. *European Journal of Biochemistry* **264**:736-45.

- Elkouby YM. 2017. All in one—integrating cell polarity, meiosis, mitosis and mechanical forces in early oocyte differentiation in vertebrates. *The International Journal of Developmental Biology* **61**:179–193.
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews* **13**:570-599.
- Epstein J, Bichard M. 1986. *Evolution of Domesticated Animals*. Longman, New York.
- Ewing JF, Raju VS, Maines MD. 1994. Induction of heme oxygenase-1 (HSP32) by hyperthermia: possible role in stress-mediated elevation of cyclic 3':5'-guanosine monophosphate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **271**:408–414.
- Farombi EO, Surh YJ. 2006. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **39**:479–491.
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayana DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK. 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics* **13**:399-408.
- Ferrara N, Gerber HP, and LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* **9**:669–676.
- Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Baranano DE, Dore S, Poss KD, Snyder SH. 1999. Heme oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nature Cell Biology* **1**:152-157.
- Fest S, Soldati R, Christiansen NM, Zenclussen ML, Kilz J, Berger E, Starke S, Lode HN, Engel C, Zenclussen AC, Christiansen H. 2015. Targeting of heme oxygenase-1 as novel immune regulator of neuroblastoma. *Cancer Therapy and Prevention* **138**:2030-2042.
- Findlay JK, Hutt KJ, Hickey M, Anderson RA. 2015. How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? *Biology of Reproduction* (e133652) DOI: 10.1095/biolreprod.115.133652.
- Florczyk U, Jazwa A, Maleszewska M, Mendel M, Szade K, Kozakowska M, Grochot-Przeczek A, Viscardi M, Czauderna S, Bukowska-Strakova K, Kotlinowski J, Jozkowicz A, Loboda A, Dulak J. 2014. Nrf2 regulates angiogenesis: effect on endothelial cells, bone marrow-derived proangiogenic cells and hind limb ischemia. *Antioxidants & Redox Signaling* **20**:1693–1708.

- Fraser ST, Midwinter RG, Berger BS, Stocker R. 2011. Heme oxygenase-1: A critical link between iron metabolism, erythropoiesis and development. *Advances in Hematology* (e473709) DOI: 10.1155/2011/473709
- Fraser ST, Midwinter RG, Coupland LA, Kong S, Berger BS, Yeo JH, Andrade OC, Cromer D, Suarna C, Lam M, Maghzal GJ, Chong BH, Parish CR, Stocker R. 2015. Heme oxygenase-1 deficiency alters erythroblastic island formation, steady-state erythropoiesis and red blood cell lifespan in mice. *Haematologica* **100**:601-610.
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potentials. *BioTechniques* **26**:112-125.
- Friedman J, Lad L, Li H, Wilks A, Poulos TL. 2004. Structural basis for novel delta-regioselective heme oxygenation in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **43**:5239–5245.
- Fujiwara T, Harigae H. 2015. Biology of heme in mammalian erythroid cells and related disorders. *Biomed Research International* (e278536) DOI: 10.1155/2015/278536.
- Gariyban L, Avashia N. 2013. Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology* **133**:1-4.
- Gazdag E, Santenard A, Ziegler-Birling C, Altobelli G, Poch O, Tora L, Torres-Padilla ME. 2009. TBP2 is essential for germ cell development by regulating transcription and chromatin condensation in the oocyte. *Genes & Development* **23**:2210–2223.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**:656-661.
- Gell DA. 2018. Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells, Molecules and Diseases* **70**: 13-42.
- Ghattas MH, Chuang LT, Kappas A, Abraham NG. 2002. Protective effect of HO-1 against oxidative stress in human hepatoma cell line (HepG2) is independent of telomerase enzyme activity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34**:1619–1628.
- Ghaziani T, Shan Y, Lambrecht RW, Donohue SE, Pietschmann T, Bartenschlager R, Bonkovsky HL. 2006. HCV proteins increase expression of heme oxygenase-1 (HO-1) and decrease expression of Bach1 in human hepatoma cells. *Journal of Hepatology* **45**:5-12.
- Ghigo A, Damilano F, Braccini L, Hirsch E. 2010. PI3K inhibition in inflammation: toward tailored therapies for specific diseases. *Bioessays* **32**:185–196.

- Ghosh S, Karin M. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109**:81-96.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology* **16**:225-260
- Gilbert SF. 2003. *Developmental Biology*. Sinauer Associates Inc. Sunderland.
- Giritharan G, Talbi S, Donjacour A, Di Sebastiano F, Dobson AT, Rinaudo PF. 2007. Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. *Reproduction* **134**:63-72.
- Giuffra E, Kijas JM, Amarger V, Carlborg O, Jeon JT, Andersson L. 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* **154**:1785-1791.
- Gong P, Hu B, Cederbaum AI. 2004. Diallyl sulfide induces heme oxygenase-1 through MAPK pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **432**:252-260.
- Goswami A, Ranganathan P, Rangnekar VM. 2006. The phosphoinositide 3-kinase/Akt1/Par-4 axis: a cancer-selective therapeutic target. *Cancer Research* **66**:2889-2892.
- Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. 2010. Mechanism of cell protection by heme oxygenase. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **50**:323-354.
- Groenen MA, Archibald AL, Uenishi H, Tuggle CK, Takeuchi Y, Rothschild MF, Rogel-Gaillard C, Park C, Milan D, Megens HJ, Li S, Larkin DM, Kim H, Frantz LA, Caccamo M, Ahn H, Aken BL, Anselmo A, Anthon C, Auvil L, Badaoui B, Beattie CW, Bendixen C, Berman D, Blecha F, Blomberg J, Bolund L, Bosse M, Botti S, Bujie Z, Bystrom M, Capitanu B, Carvalho-Silva D, Chardon P, Chen C, Cheng R, Choi SH, Chow W, Clark RC, Clee C, Crooijmans RP, Dawson HD, Dehais P, De Sapio F, Dibbitts B, Drou N, Du ZQ, Eversole K, Fadista J, Fairley S, Faraut T, Faulkner GJ, Fowler KE, Fredholm M, Fritz E, Gilbert JG, Giuffra E, Gorodkin J, Griffin DK, Harrow JL, Hayward A, Howe K, Hu ZL, Humphray SJ, Hunt T, Hornshøj H, Jeon JT, Jern P, Jones M, Jurka J, Kanamori H, Kapetanovic R, Kim J, Kim JH, Kim KW, Kim TH, Larson G, Lee K, Lee KT, Leggett R, Lewin HA, Li Y, Liu W, Loveland JE, Lu Y, Lunney JK, Ma J, Madsen O, Mann K, Matthews L, McLaren S, Morozumi T, Murtaugh MP, Narayan J, Nguyen DT, Ni P, Oh SJ, Onteru S, Panitz F, Park EW, Park HS, Pascal G, Paudel Y, Perez-Enciso M, Ramirez-Gonzalez R, Reecy JM, Rodriguez-Zas S, Rohrer GA, Rund L, Sang Y, Schachtschneider K, Schraiber JG, Schwartz J, Scobie L, Scott C, Searle S, Servin B, Southey BR, Sperber G, Stadler P, Sweedler JV, Tafer H, Thomsen B, Wali R, Wang J, Wang J, White S, Xu X, Yerle M, Zhang G, Zhang J, Zhang J, Zhao S, Rogers J, Churcher C, Schook LB. 2012. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* **491**:393-398.

- Grochot-Przeczek A, Kotlinowski J, Kozakowska M, Starowicz K, Jagodzinska J. 2014. Heme oxygenase-1 is required for angiogenic function of bone marrow-derived progenitor cells: role in therapeutic revascularization. *Antioxidants & Redox Signaling* **20**:1677–1692.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* **186**:1-85.
- Hamad AF, Jeong HY, Han JH, Rather IA. 2017. Detection of cytosolic tRNA in mammal by Northern blot analysis. *Journal of Pharmacology* **12**:243-250.
- Hart EA, Caccamo M, Harrow JL, Humphray SJ, Gilbert JGR, Trevanion S, Hubbard T, Rogers J, Rothschild MF. 2007. Lessons learned from the initial sequencing of the pig genome: comparative analysis of an 8 Mb region of pig chromosome 17. *Genome Biology* **8**:1-12.
- Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M. 2004. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* **336**:241–250.
- Hayden MS, Ghosh S. 2004. Signaling to NF- κ B. *Genes and Development* **18**: 2195-2224.
- He J, Stewart K, Kinnell HL, Anderson RA, Childs AJ. 2013. A developmental stage-specific switch from DAZL to BOLL occurs during fetal oogenesis in humans, but not mice. *PLoS One* (e73996) DOI: 10.1371/journal.pone.0073996.
- Hemmings BA, Restuccia DF. 2012. Pi3k-pkb/akt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (e011189) DOI: 10.1101/cshperspect.a011189.
- Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. 2011. Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling* **23**:1515-1527.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science* **117**:5965–5973.
- Higashimoto Y, Sugishima M, Sato H, Sakamoto H, Fukuyama K, Palmer G, Noguchi M. 2008. Mass spectrometric identification of lysine residues of heme oxygenase-1 that are involved in its interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **367**:852–858.
- Higuchi R, Fickler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11**:1026-1030.

- Hirotsu S, Chu GC, Unno M, Lee DS, Yoshida T, Park SY, Shiro Y, Ikeda-Saito M. 2004. The crystal structures of the ferric and ferrous forms of the heme complex of HmuO, a heme oxygenase of *Corynebacterium diphtheriae*. *The Journal of Biological Chemistry* **279**:11937–11947.
- Hoetzel A, Dolinay T, Schmidt R, Choi AM, Ryter SW. 2007. Carbon monoxide in sepsis. *Antioxidants & Redox Signaling* **9**:2013-2026.
- Huber WJ, Backes WL. 2007. Expression and characterization of full-length human heme oxygenase-1: the presence of intact membrane-binding region leads to increased binding affinity for NADPH cytochrome P450 reductase. *Biochemistry* **46**:12212–12219.
- Hull TD, Agarwal A. 2014. Bilirubin: a potential biomarker and therapeutic target for diabetic nephropathy. *Diabetes* **63**:2613-2616.
- Hung SY, Liou HC, Kang KH, Wu RM, Wen CC. 2008. Overexpression of heme oxygenase-1 protects dopaminergic neurons against 1-methyl-4 -phenylpyridinium-induced neurotoxicity. *Molecular Pharmacology* **74**:1564–1575.
- Hwang HW, Lee JR, Chou KY, Suen CS, Hwang MJ, Chen C, Shieh RC, Chau LY. 2009. Oligomerization is crucial for the stability and function of heme oxygenase-1 in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* **284**:22672–22679.
- Chen J. 2014. Heme oxygenase in neuroprotection: from mechanisms to therapeutic implications. *Reviews in Neurosciences* **25**:269–280.
- Chen J, Melton C, Suh N, Oh JS, Horner K, Xie F, Sette C, Blleloch R, Conti M. 2011. Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition. *Genes & Development* **25**:755–766.
- Chen K, Gunter K, Maines MD. 2000. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. *Journal of Neurochemistry* **75**:304–313.
- Chen K, Baxter T, Muir WM, Groenen MA, Schook LB. 2007. Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (*Sus scrofa*). *International Journal of Biological Sciences* **3**:153-165.
- Chen L, Liao C, Lai L, Tsai MH, Chuang EY. 2019. Semaphorin 6A attenuates the migration capability of lung cancer cells via the NRF2/HMOX1. *Scientific Reports* (e13302) DOI: 10.1038/s41598-019-49874-8.
- Chen-Roetling J, Regan RF. 2006. Effect of heme oxygenase-1 on the vulnerability of astrocytes and neurons to hemoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **350**:233–237.

- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* **20**:1717-1723.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**:834–840.
- Chung J, Chen C, Paw BH. 2012. Heme metabolism and erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology* **19**:156-162.
- Ibrahim Z, Bush J, Awwad M, Wagner R, Wells K, Cooper DK. 2006. Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems. *Xenotransplantation* **13**:488-499.
- Immenschuh S, Baumgart-Vogt E, Mueller S. 2010. Heme oxygenase-1 and iron in liver inflammation: a complex alliance. *Current Drug Targets* **11**:1541–1550.
- Irie N, Weinberger L, Tang WW, Kobayashi T, Viukov S, Manor YS, Dietmann S, Hanna JH, Surani MA. 2015. SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* **160**:253–268.
- Jaramillo MC, Zhang DD. 2013. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes and Development* **27**:2179-2191.
- Jensen E. 2014. Technical review: In situ hybridization. *The Anatomical Record* **297**:1349-1353.
- Jia X, Ju H, Yang L, Tian Y. 2012. A novel multiplex polymerase chain reaction assay for profile analyses of gene expression in peripheral blood. *BMC Cardiovascular Disorders* **12**:51.
- Josefsen K, Nielsen H. 2011. Northern blotting analysis. *Methods in Molecular Biology* **703**:87-105.
- Jozkowicz A, Huk I, Nigisch A, Weigel G, Dietrich W, Motterlini R, Dulak J. 2003. Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. *Antioxidants & Redox Signaling* **5**:155–162.
- Kagiya Go, Ogawa R, Ito S, Fukuda S, Hatashita M, Tanaka Y, Yamamoto K, Kondo T. 2009. Identification of a cis-acting element responsive to ultrasound in the 5'-flanking region

- of the human heme oxygenase-1 gene. *Ultrasound in Medicine and Biology* **35**:155-164.
- Kakhlon O, Cabantchik ZI. 2002. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radical Biology & Medicine* **33**:1037-1046.
- Kapitulnik J, Maines MD. 2009. Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin. *Trends in Pharmacological Sciences* **30**:129-137.
- Kappas A, Simionatto CS, Drummond GS, Sassa S, Anderson KE. 1985. The liver excretes large amounts of heme into bile when heme oxygenase is inhibited by Sn-protoporphyrin. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* **82**:896-900.
- Kaptureczak MH, Wasserfall C, Brusko T, Campbell-Thompson M, Ellis TM, Atkinson MA, Agarwal A. 2004. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *The American Journal of Pathology* **165**:1045–1053.
- Kaspar JW, Jaiswal AK. 2010. Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* **285**:153–162.
- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **47**:1304–1309.
- Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S, Nakanishi I. 2002. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Human Pathology* **33**:125-130.
- Kietzmann T, Samoylenko A, Immenschuh S. 2003. Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **278**:17927-17936.
- Kijas JM, Andersson L. 2001. A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near- complete mtDNA genome. *Journal of Molecular Evolution* **52**: 302-308.
- Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. 2005. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**: 558-567.

- Kim HJ, Khalimonchuk O, Smith PM, Winge DR. 2012. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1823**:1604-1616.
- Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SW, Choi AM. 2004. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB Journal* **18**: 1080–1089.
- Kim C, Sano Y, Todorova K, Carlson BA, Arpa L, Celada A, Lawrence T, Otsu K, Brissette JL, Arthur JS, Park JM. 2008. The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. *Nature Immunology* **9**:1019-1027.
- Kim W, Bennett EJ, Huttlin EL, Guo A, Li J, Possemato A, Sowa ME, Rad R, Rush J, Comb MJ, Harper JW, Gygi SP. 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Molecular Cell* **44**:325–340.
- Kim YM, Pae HO, Park JE, Lee YC, Woo JM, Kim NH, Choi YK, Lee BS, Kim SR, Chung HT. 2011. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* **14**:137-167.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**:1-24.
- Koetsier G, Cantor E. 2019. A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers. New England Biolabs. Available from https://www.neb.com//media/catalog/applicationnotes/mvs_analysis_of_na_concentration_and_purity.pdf?rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc (accessed May 2020).
- Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. 2008. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *International Journal of Hematology* **88**:7-15.
- Komander D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions* **37**:937-953.
- Kutty RK, Naginemi GN, Kutty G, Hooks JJ, Chader GJ, Wiggert B. 1994. Increased expression of heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells by transforming growth factor beta. *Journal of Cellular Physiology* **159**:371-378.
- Lad L, Schuller DJ, Shimizu H, Friedman J, Li H, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL. 2003. Comparison of the heme-free and -bound crystal structures of human heme oxygenase-1. *The Journal of Biological Chemistry* **278**:7834–7843.

- Landgraf A, Reckmann B, Pingoud A. 1991. Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. *Analytical Biochemistry* **193**: 231-235.
- Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson H, Brand T, Willerslev E, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A. 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* **307**:1618-1621.
- Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. 2008. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacological Research* **58**:262-270.
- Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landry PA, Gelfand DH. 1993. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods and Applications* **2**:275-287.
- Lebedev AV, Paul S, Yee J, Timoschchuk VA, Shurm J, Miyagi K, Kellum J, Hogrefe RI, Zon RI. 2008. Hot start PCR with heat-activatable primers: a novel approach for improved PCR performance. *Nucleic Acids Research* (e131) DOI: 10.1093/nar/gkn575.
- Lee BS, Heo JH, Kim YM, Shim SM, Pae HO, Kim YM, Chung HT. 2006. Carbon monoxide mediates heme oxygenase-1 induction via Nrf2 activation in hepatoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **343**:965-972.
- Lee D, Xiong S, Xiong WC. 2013. General introduction to in situ hybridization protocol using nonradioactively labeled probes to detect mRNAs on tissue sections. *Methods in Molecular Biology* **1018**:165-174.
- Lee TS, Chau LY. 2002. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nature Medicine* **8**:240–246.
- Lee YS, Latham KE, Vandervoort CA. 2008. Effects of in vitro maturation on gene expression in rhesus monkey oocytes. *Physiological Genomics* **35**:145–158.
- Lever JM, Boddu R, George JF, Agarwal A. 2016. Heme Oxygenase-1 in Kidney Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* **25**:165-183.
- Levy S, Jaiswal AK, Forman HJ. 2009. The role of c-Jun phosphorylation in EpRE activation of phase II genes. *Free Radical Biology and Medicine* **47**:1172–1179.
- Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Duan EK, Hsueh AJ. 2010. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:10280–10284.

- Li Q, Guo Y, Ou Q, Cui C, Wu WJ, Tan W, Lanceta LB, Sanganalmath SK, Dawn B, Shinmura K, Rokosh GD, Wang S, Bolli R. 2009. Gene transfer of inducible nitric oxide synthase affords cardioprotection by upregulating heme oxygenase-1 via a nuclear factor- κ B-dependent pathway. *Circulation* **120**:1222–1230.
- Li M, Yan J, Zhi X, Wang Y, Hang J, Qiao J. 2019. Gene expression during oogenesis and oocyte development. *The ovary* **13**:205-216.
- Li Volti G, Sacerdoti D, Sangras B, Vanella A, Mezentsev A, Scapagnini G, Falck JR, Abraham NG. 2005. Carbon monoxide signaling in promoting angiogenesis in human microvessel endothelial cells. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**:704-710.
- Liang Y, Zhou Y, Shen P. 2004. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cellular and Molecular Immunology* **1**:343-350.
- Lin HH, Chen YH, Yet SF, Chau LY. 2009. After vascular injury, heme oxygenase-1/carbon monoxide enhances re-endothelialization via promoting mobilization of circulating endothelial progenitor cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **7**:1401–1408.
- Lin HH, Chen YH, Chiang MT, Huang PL, Chau LY. 2013. Activator protein-2 α mediates carbon monoxide-induced stromal cell-derived factor-1 α expression and vascularization in ischemic heart. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vasclar Biology* **33**:785–794.
- Lin PH, Lan WM, Chau LY. 2012. TRC8 suppresses tumorigenesis through targeting heme oxygenase-1 for ubiquitination and degradation. *Oncogene* **32**:2325–2334.
- Liu W, Saint DA. 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry* **302**:52-59.
- Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L. 2017. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (e2525967) DOI: 10.1155/2017/2525967.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* **25**:402-408.
- Loboda A, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Rutkowski AJ, Cisowski J, Agarwal A, Jozkowicz A, Dulak J. 2008. Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling* **10**:1767-1812.

- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. Molecular cell biology. Freeman and Company. New York.
- Lundeberg, J., Wahlberg, J., Uhlen, M., 1991. Rapid colorimetric quantification of PCR-amplified DNA. *BioTechniques* **10**:68–75.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. 1995. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development* **9**:2266-2278.
- Lynes EM, Bui M, Yap MC, Benson MD, Schneider B, Ellgaard L, Berthiaume LG, Simmen T. 2012. Palmitoylated TMX and calnexin target to the mitochondria-associated membrane. *EMBO Journal* **31**:457–470.
- Ma J, Flemr M, Strnad H, Svoboda P, Schultz RM. 2013. Maternally recruited DCP1A and DCP2 contribute to messenger RNA degradation during oocyte maturation and genome activation in mouse. *Biology of Reproduction* **88**:1-12.
- Ma X, Wang L, Shi Z, Chen W, Yang X, Hu Y, Zheng C, Jiang Z. 2019. Mechanism of continuous high temperature affecting growth performance, meat quality, and muscle biochemical properties of finishing pigs. *Genes & Nutrition* **14**:23.
- MacLennan M, Crichton JH, Playfoot CJ, Adams IR. 2015. Oocyte development, meiosis and aneuploidy. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **45**:68–76.
- MacLeod AK, McMahon M, Plummer SM, Higgins LG, Penning TM, Igarashi K, Haynes JD. 2009. Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1–NRF2 pathway, and not the BACH1–NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis* **30**:1571–1580.
- Maines MD. 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **37**:517–554.
- Mandal P, Park PH, McMullen MR, Pratt BT, Nagy LE. 2010. The anti-inflammatory effects of adiponectin are mediated via a heme oxygenase-1-dependent pathway in rat Kupffer cells. *Hepatology* **51**:1420-1429.
- Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**:1261-1274.
- Markholt S, Grondahl ML, Ernst EH, Andersen CY, Ernst E, Lykke-Hartmann K. 2012. Global gene analysis of oocytes from early stages in human folliculogenesis shows high expression of novel genes in reproduction. *Molecular Human Reproduction* **18**:96–110.

- Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM, Cuadrado A. 2004. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *The Journal of Biological Chemistry* **279**:8919–8929.
- Mauad TH, Nieuwkerk CM, Dingemans KP, Smit JJ, Schinkel AH, Notenboom RG, Bergh Weeman MA, Verkruisen RP, Groen AK, Oude Elferink RP. 1994. Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepato-1581 carcinogenesis. *The American Journal of Pathology* **145**:1237-1245.
- Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT, Aichberger KJ, Bilban M. 2004. Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Research* **64**:3148–3154.
- McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Haynes JD. 2006. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a tethering mechanism, a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 24756-24768.
- Means RT, Krantz SB. 1992. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* **80**:1639-1647.
- Meis JE, Khanna A. 2009. RNA amplification and cDNA synthesis for qRT-PCR directly from a single cell. *Nature Methods* **6**:12-13.
- Mense SM, Zhang L. 2006. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Research* **16**:681-692.
- Merkwitz C, Lochhead P, Tsikolia N, Koch D, Sygnecka K, Sakurai M, Spanel-Borowski K, Ricken AM. 2011. Expression of KIT in the ovary, and the role of somatic precursor cells. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* **46**:131-184.
- Miller AJ, Spence JR. 2017. In vitro models to study human lung development, disease and homeostasis. *Physiology* **32**:246–260.
- Momtazi AA, Shahabipour F, Khatibi S, Johnston TP, Pirro M, Sahebkar A. 2016. Curcumin as a microRNA regulator in cancer: a review. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **171**:1–38.
- Moore MR. 1998. The biochemistry of heme synthesis in porphyria and in the porphyrias. *Clinics in Dermatology* **16**:203–223.

- Morikawa T, Kajimura M, Nakamura T, Hishiki T, Nakanishi T, Yukutake Y, Nagahata Y, Ishikawa M, Hattori K, Takenouchi T, Takahashi T, Ishii I, Matsubara K, Kabe Y, Uchiyama S, Nagata E, Gadalla MM, Snyder SH, Suematsu M. 2012. Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **109**: 1293–1298.
- Morris RG, Arends MJ, Bishop PE. 1990. Sensitivity of digoxigenin and biotin-labeled probes for detection of human papillomavirus by in situ hybridization. *Journal of Clinical Pathology* **43**:800-805.
- Morse D, Choi AM. 2005. Heme oxygenase-1: from bench to bedside. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **172**:660-670.
- Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD, Yamamoto M. 2002. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* **294**:1–12.
- Motterlini R, Mann BE, Foresti R. 2005. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **14**:1305-1318.
- Müllebnner A, Moldzio R, Redl H, Kozlov AV, Duvigneau C. 2015. Heme degradation by heme oxygenase protects mitochondria but induces ER stress via formed bilirubin. *Biomolecules* **5**:679-701.
- Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* **262**:56–61.
- Mullis KB. 1991. The polymerase chain reaction in an anemic mode: How to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion. *PCR Methods and Applications* **1**:1–4.
- Mullis KB, Faloona F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymology*. **155**:335-350.
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Horn GT, Ehrlich HA. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**:263-273.
- Murakami A, Fujimori Y, Yoshikawa Y, Yamada S, Tamura K. 2012. Heme oxygenase-1 promoter polymorphism is associated with risk of malignant mesothelioma. *Lung* **190**:333–337.

- Naidu S, Wijayanti N, Santoso S, Kietzmann T, Immenschuh S. 2008. An atypical NFkappa B-regulated pathway mediates phorbol ester-dependent heme oxygenase-1 gene activation in monocytes. *The Journal of Immunology* **181**:4113–4123.
- Němeček D, Dvořáková M, Sedmíková M. 2017. Heme oxygenase/carbon monoxide in the female reproductive system: an overlooked signalling pathway. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **8**:1-12.
- Němeček D, Dvořáková M, Heroutová I, Chmelíková E, Sedmíková M. 2017. Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during in vitro aging. *PeerJ*. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5633033/> (accessed February 2020).
- Nguyen T, Yang CS, Pickett CB. 2004. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radical Biology and Medicine* **37**: 433-441.
- Ning W, Song R, Li C, Park E, Mohsenin A, Choi AM, Choi ME. 2002. TGF-beta1 stimulates HO-1 via the p38 mitogen-activated protein kinase in A549 pulmonary epithelial cells. *American Journal of Physiology* **283**:1094-1102.
- Nitti M, Piras S, Marinari UM, Moretta L, Pronzato MA, Furfaro AL. 2017. HO-1 induction in cancer progression: a matter of cell adaptation. *Antioxidants* (e6020029) DOI: 10.3390/antiox6020029.
- Nowis D, Legat M, Grzela T, Niderla J, Wilczek E. 2006. Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene* **25**:3365–3374.
- Oeckinghaus A, Ghosh S. 2009. *The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Ogawa K, Sun J, Taketani S, Nakajima O, Nishitani C, Sassa S, Hayashi N, Yamamoto M, Shibahara S, Fujita H, Igarashi K. 2001. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *The EMBO Journal* **20**: 2835-2843.
- Ogun AS, Valentine M. 2019. *Biochemistry, Heme Synthesis*. StatPearls Publishing. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537329/> (accessed March 2020).
- Ollinger R, Bilban M, Erat A, Froio A, McDaid J, Tyagi S, Csizmadia E, Graca-Souza AV, Liloia A, Soares MP, Otterbein LE, Usheva A, Yamashita K, Bach FH. 2005. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* **112**:1030-1039.

- Origassa CS, Camara NO. 2013. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury. *World Journal of Hepatology* **5**:541-549.
- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. 2002. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109**:121-131.
- Otterbein LE, Foresti R, Motterlini R. 2016. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in the heart. *Circulation Research* **118**:1940-1959.
- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature Medicine* **6**:422-428.
- Ozen M, Zhao H, Lewis DB, Wong RJ, Stevenson DK. 2015. Heme oxygenase and the immune system in normal and pathological pregnancies. *Frontiers in Pharmacology* **6**:1-13.
- Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk Rainer, Immenschuch S. 2010. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochemical Pharmacology* **80**:1895-1903.
- Park DJ, Agarwal A, George JF. 2010. Heme oxygenase-1 expression in murine dendritic cell subpopulations. Effect on CD8+ dendritic cell differentiation in vivo. *The American Journal of Pathology* **176**:2831-2839.
- Peirson SN, Butler JN. 2007. *Methods in molecular biology*. Humana Press Inc. New Jersey.
- Pepling ME. 2006. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* **44**:622-632.
- Piantadosi CA. 2008. Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* **45**:562-569.
- Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L. 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *The FASEB Journal* **15**:1118-1131.
- Pirro M, Schillaci G, Romagno PF, Mannarino MR, Bagaglia F. 2009. Influence of short-term rosuvastatin therapy on endothelial progenitor cells and endothelial function. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* **14**:14-21.
- Podkalicka P, Mucha O, Józkwicz A, Dulak J, Loboda A. 2018. Heme oxygenase inhibition in cancers: possible tools and targets. *Contemporary Oncology* **22**:23-32.
- Poss KD, Thomas MJ, Ebralidze AK, O'Dell TJ, Tonegawa S. 1995. Hippocampal long-term potentiation is normal in heme oxygenase-2 mutant mice. *Neuron* **15**:867-873.

- Poss KD, Tonegawa S. 1997. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:10919-10924.
- Potteti HR, Tamatam CR, Marreddy R, Reddy NM, Noel S, Rabb H, Reddy SP. 2016. Nrf2-AKT interactions regulate heme oxygenase 1 expression in kidney epithelia during hypoxia and hypoxia-reoxygenation. *American Journal of Physiology* **311**:1025-1034.
- Poulos TL. 2014. Heme enzyme structure and function. *Chemical Reviews* **114**:3919-3962.
- Prawan A, Kundu JK, Surh YJ. 2005. Molecular basis of heme oxygenase-1 induction: implications for chemoprevention and chemoprotection. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**:1688–1703.
- Protzer U, Seyfried S, Quasdorff M, Sass G, Svorcova M, Webb D, Bohne F, Hösel M, Schirmacher P, Tiegs G. 2007. Antiviral activity and hepatoprotection by heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* **133**:1156-1165.
- Qian X, Lloyd RV. 2003. Recent developments in signal amplification methods for in situ hybridization. *Diagnostic Molecular Pathology* **12**:1-13.
- Qu Y, Boutjdir M. 2007. RNase protection assay for quantifying gene expression levels. *Methods in Molecular Biology* **366**:145-158.
- Raman M, Chen W, Cobb MH. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**:3100-3112.
- Ramzan F, Younis A, Lim KB. 2017. Application of genomic in situ hybridization in horticultural science. *International Journal of Genomics* **2017**:1-9.
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* **117**:1281-1283.
- Reichard JF, Motz GT, Puga A. 2007. Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Nucleic Acids Research* **35**:7074-7086.
- Reichard JF, Sartor MA, Puga A. 2008. BACH1 is a specific repressor of HMOX1 that is inactivated by arsenite. *The Journal of Biological Chemistry* **283**:22363-22370.
- Ricchetti GA, Williams LM, Foxwell BM. 2004. Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *Journal of Leukocyte Biology* **76**:719–726.

- Richards JS, Pangas SA. 2010. The ovary: basic biology and clinical implications. *The Journal of Clinical Investigation* **120**:963-972.
- Rischowsky B. 2007. The state of the worlds animal genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**:365-386.
- Ryter SW. 2012. Bile pigments in pulmonary and vascular disease. *Frontiers in Pharmacology* **3**:1-8.
- Ryter SW, Alam J, Choi AM. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological Reviews* **86**:583-650.
- Ryter SW, Choi AM. 2009. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **41**:251-260.
- Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. 2002. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Molecular and Cellular Biochemistry* **234**:249-263.
- Ryter SW, Tyrrell RM. 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radical Biology & Medicine* **28**:289-309.
- Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M, Wagner EF. 2004. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Molecular Cell* **15**:713-725.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Sanchez F, Smitz J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1822**:1896-1912.
- Sass G, Barikbin R, Tiegs G. 2012. The multiple functions of heme oxygenase-1 in the liver. *Zeitschrift Für Gastroenterologie* **50**:34-40.
- Sass G, Leukel P, Schmitz V, Raskopf E, Ocker M, Neureiter D, Meissnitzer M, Tasika E, Tannapfel A, Tiegs G. 2008. Inhibition of heme oxygenase-1 expression by small interfering RNA decreases orthotopic tumor growth in livers of mice. *International Journal of Cancer* **123**:1269-1277.

- Sass G, Seyfried S, Soares MP, Yamashita K, Kaczmarek E, Neuhuber WL, Tiegs G. 2004. Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury. *Hepatology* **40**:1128-1135.
- Sawa T, Mounawar M, Tatemichi M, Gilibert I, Katoh T, Ohshima H. 2008. Increased risk of gastric cancer in Japanese subjects is associated with microsatellite polymorphisms in the heme oxygenase-1 and the inducible nitric oxide synthase gene promoters. *Cancer Letters* **269**:78–84.
- Seif F, Khoshmirasfa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. 2017. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Communication and Signaling (e12964)* DOI: 10.1186/s12964-017-0177-y.
- Shan LH. 2013. Northern blot. *Methods in Enzymology* **530**:75-87.
- Sharkey DJ, Scalice ER, Cristy KG, Atwood SM, Daiss JL. 1994. Antibodies as thermolabile switches: high-temperature triggering for the polymerase chain reaction. *Biotechnology* **12**:506-509.
- Sharkey FH, Banat IM, Marchant R. 2004. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:3795-3806.
- Shaulian E, Karin M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology* **4**: 131-136.
- She H, Xiong S, Lin M, Zandi E, Giulivi C, Tsukamoto H. 2002. Iron activates NF-kappaB in Kupffer cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **283**:719-726.
- Shibahara S, Muller RM, Taguchi H. 1987. Nucleotide sequence and organization of the rat heme oxygenase gene. *Journal of Biological Chemistry* **262**:6795-6802.
- Shibuya H, Watanabe Y. 2014. The meiosis-specific modification of mammalian telomeres. *Cell Cycle* **13**:2024–2028.
- Shoham Z. 2002. The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation. *Fertility and Sterility* **77**:1170–1177.
- Shuai K, Liu B. 2003. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews Immunology* **3**:900-911.
- Schuller DJ, Wilks A, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL. 1999. Crystal structure of human heme oxygenase-1. *Nature Structural Biology* **6**:860–867.

- Schuller DJ, Zhu W, Stojiljkovic I, Wilks A, Poulos TL. 2001. Crystal structure of heme oxygenase from the gram-negative pathogen *Neisseria meningitidis* and a comparison with mammalian heme oxygenase-1. *Biochemistry* **40**:11552–11558.
- Schook LB, Beever JE, Rogers J, Humphray S, Archibald A, Chardon P, Milan D, Rohrer G, Eversole K. 2005. Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC): a strategic roadmap for sequencing the pig genome. *Comparative and Functional Genomics* **6**:251–255.
- Schwartz JC, Hemmink JD, Graham SP, Tchilian E, Charleston B, Hammer SE, Ho CS, Hammond JA. 2018. The major histocompatibility complex homozygous inbred Babraham pig as a resource for veterinary and translational medicine. *HLA* **92**:40–43.
- Sigmon J, Larcom LL. 1996. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis* **17**:1524-1527.
- Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. 2004. The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *American Journal of Physiology* **286**:425–441.
- Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, Yu J, Tsui TY, Bach FH. 2004. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *Journal of Immunology* **172**:3553-3563.
- Son Y, Lee JH, Chung HT, Pae HO. 2013. Therapeutic roles of heme oxygenase-1 in metabolic diseases: curcumin and resveratrol analogues as possible inducers of heme oxygenase-1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (e639541) DOI: 10.1155/2013/639541.
- Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pae HO. 2010. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: How can ROS activate MAPK pathways? *Journal of Signal Transduction* (e792639) DOI: 10.1155/2011/792639.
- Southern E. 2006. Southern blotting. *Nature Protocols* **1**:1-8.
- Smith C, Osborn M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (qPCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **67**:6-20.
- Stahlberg A, Kubista M, Pfaffl M. 2004. Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clinical Chemistry* **50**:1678-1680.
- Stephenson FH. 2016. *Calculations for molecular biology and biotechnology*. Academic Press. London.
- Stevens JM, Daltrop O, Allen JW, Ferguson SJ. 2004. C-type cytochrome formation: chemical and biological enigmas. *Accounts of Chemical Research* **37**:999–1007.

- Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. 2003. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin proteasome pathway and stabilization by cadmium. *Journal of Biological Chemistry* **278**:2396-2402.
- Su W, Yuan Y, Zhang L, Jiang Y, Gan X, Bai X, Peng J, Wu J, Liu Y, Lin S. 2019. Selection of the optimal reference genes for expression analyses in different materials of *Eriobotrya japonica*. *Plant Methods* (e13007) DOI: 10.1186/s13007-019-0391-2.
- Su YQ, Sugiura K, Woo Y, Wigglesworth K, Kamdar S, Affourtit J, Eppig JJ. 2007. Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology* **302**:104–117.
- Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* **135**:111–121.
- Sugishima M, Hagiwara Y, Zhang X, Yoshida T, Migita CT, Fukuyama K. 2005. Crystal structure of dimeric heme oxygenase-2 from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in complex with heme. *Biochemistry* **44**:4257–4266.
- Sugishima M, Omata Y, Kakuta Y, Sakamoto H, Noguchi M, Fukuyama K. 2000. Crystal structure of rat heme oxygenase-1 in complex with heme, *FEBS Letters* **471**:61–66.
- Sugishima M, Migita CT, Zhang X, Yoshida T, Fukuyama K. 2004. Crystal structure of heme oxygenase-1 from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in complex with heme. *European Journal of Biochemistry* **271**:4517–4525.
- Sugishima M, Sakamoto H, Kakuta Y, Omata Y, Hayashi S, Noguchi M, Fukuyama K. 2002. Crystal structure of rat apo-heme oxygenase (HO-1): mechanism of heme binding in HO-1 inferred from structural comparison of the apo and heme complex form. *Biochemistry* **41**:7293–7300.
- Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M, Igarashi K. 2002. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *The EMBO Journal* **21**:5216-5224.
- Sun SC, Kim NH. 2012. Spindle assembly checkpoint and its regulators in meiosis. *Human Reproduction Update* **18**:60–72.
- Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Frazier KS. 2011. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Veterinary Pathology* **49**:344-356.

- Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. 2014. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced Biomedical Research* (e127998) DOI: 10.4103/2277-9175.127998.
- Tanaka G, Aminuddin F, Akhabir L, He JQ, Shumansky K, Connett JE, Anthonisen NR, Abboud RT, Paré PD, Sandford AJ. 2011. Effect of heme oxygenase-1 polymorphisms on lung function and gene expression. *BMC Medical Genetics* **12**:1-8.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **61**:748-755.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1969. Microsomal heme oxygenase-characterization of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **244**:6388-6394.
- Thomas FH, Vanderhyden BC. 2006. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* (e16611364) DOI: 10.1186/1477-7827-4-19.
- True AL, Olive M, Boehm M, San H, Westrick RJ, Raghavachari N, Xu X, Lynn EG, Sack MN, Munson PJ, Gladwin MT, Nabel EG. 2007. Heme oxygenase-1 deficiency accelerates formation of arterial thrombosis through oxidative damage to the endothelium, which is rescued by inhaled carbon monoxide. *Circulation Research* **101**:893-901.
- Tsoyi K, Lee TY, Lee YS, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC. 2009. Heme-oxygenase-1 induction and carbon monoxide-releasing molecule inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced high – mobility group box 1 release in vitro and improve survival of mice in LPS – and cecal ligation and puncture-induced sepsis model in vivo. *Molecular Pharmacology* **76**:173-182.
- Tyagi S, Kramer FR. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* **14**:303-308.
- Tzima S, Victoratos P, Kranidioti K, Alexiou M, Kollias G. 2009. Myeloid heme oxygenase-1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN-beta production. *Journal of Experimental Medicine* **206**:1167-1179.
- Unno M, Matsui T, Ikeda-Saito M. 2007. Structure and catalytic mechanism of heme oxygenase. *The Royal Society of Chemistry* **24**:553-570.

- Vairano M, Dello Russo C, Pozzoli G, Tringali G, Preziosi P, Navarra P. 2001. A functional link between heme oxygenase and cyclooxygenase activities in cortical rat astrocytes. *Biochemical Pharmacology* **61**:437–441.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**:1-19.
- Verlhac MH, Terret ME. 2016. Oocyte maturation and development. *F1000Research* **5**:1–8.
- Vishnu PG, Punyakumari B, Ekambaram B, Prakash MG, Subramanyam BV. 2015. Chromosomal profile of indigenous pig (*Sus scrofa*). *Veterinary World* **8**:183–186.
- Wagner EF, Nebreda AR. 2009. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer* **9**:537-549.
- Walsh PS, Erlich HA, Higuchi R. 1992. Preferential PCR amplification of alleles: Mechanisms and solutions. *PCR. Methods and Applications* **1**:241-250.
- Wang G, Hamid T, Keith RJ, Zhou G, Partridge CR. 2010. Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. *Circulation* **121**:1912–1925.
- Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BS, Kim JJ. 1997. Three dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:8411–8416.
- Warr A, Affara N, Aken B, Beiki H, Bickhart DM, Billis K, Chow W, Eory L, Finlayson HA, Flicek P, Giron CG, Griffin DK, Hall R, Hannum G, Hourlier T, Howe K, Hume DA, Izuogu O, Kim K, Koren S, Liu H, Manchanda N, Martin FJ, Nonneman DJ, O'Connor RE, Phillipy AM, Rohrer GA, Rosen BD, Rund LA, Sargent CA, Schook LB, Schroeder SG, Schwartz AS, Skinner BM, Talbot R, Tseng E, Tuggle CK, Watson M, Smith TPL, Archibald AL. 2020. An improved pig reference genome sequence to enable pig genetics and genomics research. *Giga Science* **9**:1-14.
- Waters DL, Shapter FM. 2014. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods in Molecular Biology* **1099**:65-75.
- Wayne WG, Nakamura RM, Kiechle FL, Strom C. 2009. *Molecular diagnostic: techniques and application for the clinical laboratory*. Academic Press. London.
- Waza AA, Hamid Z, Ali S, Bhat SA, Bhat MA. 2018. A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. *Inflammation Research* **67**:579-588.

- Weier HU, Gray JW. 1988. A programmable system to perform the polymerase chain reaction. *DNA* **7**:441–447.
- Weis N, Weigert A, Knethen A, Brune B. 2009. Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. *Molecular Biology of the Cell* **20**:1280–1288.
- Wen F, Brown KE, Britigan BE, Schmidt WN. 2008. Hepatitis C core protein inhibits induction of heme oxygenase-1 and sensitizes hepatocytes to cytotoxicity. *Cell Biology and Toxicology* **24**:175-188.
- Whitcombe D, Theaker J, Guy S. 1999. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology* **17**:804–807.
- White KA, Marletta MA. 1992. Nitric oxide synthase is a cytochrome p-450 type hemoprotein. *Biochemistry* **31**:6627–6631.
- Wilks A, Ortiz de Montellano PR. 1993. Rat liver heme oxygenase. High level expression of truncated soluble form and nature of the meso-hydroxylating species. *The Journal of Biological Chemistry* **268**:22357–22362.
- Williams MA. 2010. Stabilizing the code-methods to preserve RNA. *Biomark Insights* **5**:139-143.
- Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C, Kemp PJ. 2004. Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* **306**:2093–2097.
- Wittwer CT, Garling DJ. 1991. Rapid cycle DNA amplification: Time and temperature optimization. *BioTechniques* **10**:76-85.
- Wong ML, Medrano JF. 2005. Real-time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques* **39**:75-85.
- Yan LJ, Christians ES, Liu L, Xiao X, Sohal RS, Benjamin IJ. 2002. Mouse heat shock transcription factor 1 deficiency alters cardiac redox homeostasis and increases mitochondrial oxidative damage. *The EMBO Journal* **21**:5164-5172.
- Yang H, Magilnick N, Lee C, Kalmaz D, Ou X, Chan JY, Lu SC. 2005. Nrf1 and Nrf2 regulate rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit transcription indirectly via NF-kappaB and AP-1. *Moleculat and Cellular Biology* **25**:5933–5946.
- Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K. 1999. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *Journal of Clinical Investigation* **103**:23–29.

- Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, Ith B, Mělo LG, Zhang L, Ingwall JS, Dzau VJ, Lee ME, Perrella MA. 2001. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circulation Research* **89**:168–173.
- Yoshida T, Biro P, Cohen T, Muller RM, Shibahara S. 1988. Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. *European Journal of Biochemistry* **171**:457-61.
- Yoshida T, Kikuchi G. 1978. Features of the reaction of heme degradation catalyzed by the reconstituted microsomal heme oxygenase system. *The Journal of Biological Chemistry* **253**: 4230–4236.
- Yoshida T, Migita CT. 2000. Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *Journal of Inorganic Biochemistry* **82**:33-41.
- Yuan X, Rietzschel N, Kwon H, Walter AB, Hanna DA, Phillips JD, Raven EL, Reddi AR, Hamza I. 2016. Regulation of intracellular heme trafficking revealed by subcellular reporters. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* **113**:5144-5152.
- Zenclussen ML, Casalis PA, Jensen F, Woidacki K, Zenclussen AC. 2014. Hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate heme oxygenase-1 expression in the uterus. *Frontiers in Endocrinology* (e00032) DOI: 10.3389/fendo.2014.00032.
- Zenclussen ML, Jensen F, Rebelo S, El-Mousleh T, Casalis PA, Zenclussen AC. 2011. Heme oxygenase-1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization and corpora lutea maintenance. *American Journal of Reproductive Immunology* **67**:376-382.
- Zenclussen ML, Linzke N, Schumacher A, Fest S, Meyer N, Casalis PA, Zenclussen AC. 2015. Heme oxygenase-1 is critically involved in placentation, spiral artery remodeling, and blood pressure regulation during murine pregnancy. *Frontiers in Pharmacology* (e00291) DOI: 10.3389/fphar.2014.00291.
- Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Asahara T, Tokunaga F, Iwai K, Igarashi K. 2007. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. *Molecular and Cellular Biology* **27**:6962–6971.
- Zhang T, Bu P, Zeng J, Vancura A. 2017. Increased heme synthesis in yeast induces a metabolic switch from fermentation to respiration even under conditions of glucose repression. *The Journal of Biological Chemistry* **292**:16942-16954.

- Zhang X, Bedard EL, Potter R, Zhong R, Alam J, Choi AM, Lee PJ. 2002. Mitogen-activated protein kinases regulate HO-1 gene transcription after ischemiareperfusion lung injury. *American Journal of Physiology* **283**:815-829.
- Zhang X, Guo J, Wei X, Niu C, Jia M, Li Q, Meng D. 2018. Bach1: Function, Regulation, and Involvement in Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* (e1347969) DOI: 10.1155/2018/1347969.
- Zhang X, Mosser DM. 2008. Macrophage activation by endogenous danger signals. *The Journal of Pathology* **214**:161-178.
- Zhang X, Sato M, Sasahara M, Migita CT, Yoshida T. 2004. Unique features of recombinant heme oxygenase of *Drosophila melanogaster* compared with those of other heme oxygenases studied, *European Journal of Biochemistry* **271**:1713–1724.
- Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, Yao J, Zhou L, Zeng Y, Li H, Li Y, Shi J, An W, Hancock SM, He F, Qin L, Chin J, Yang P, Chen X, Lei Q, Xiong Y, Guan KL. 2010. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* **327**:1000–1004.
- Zuckerbraun BS, Chin BY, Bilban M, d'Avila JC, Rao J, Billiar TR, Otterbein LE. 2007. Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB Journal* **21**:1099-1106.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ALAS	syntáza kyseliny 5'- aminolevulinové
AP	aktivační protein
ATP	adenosintrifosfát
BR	bilirubin
BV	biliverdin
Co-A	koenzym A
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleosid trifosfát
ERK	extracelulární kinázy
EtBr	ethidium bromid
GTP	guanosin- 5'- trifosfát
HO	hem oxygenáza
HSF	faktory tepelného stresu
HSP	proteiny tepelného stresu
HSR	reakce na tepelný stres
IL	interleukin
LPS	lipopolysacharid
MAPK	mitogenem aktivované proteinové kinázy
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotidfosfát
NOS	syntáza oxidu dusnatého
PCR	polymerázová řetězová reakce
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
QTL	kvantitativní lokusové znaky
RE	responzivní elementy
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní druhy kyslíku
T _m	teplota tání
UTR	nepřekládaná oblast
UV	ultrafialové

GTATGTGTCGTGGTGGTTCCAGCCGTGACGGAGGGTAATATGATGGATGTGGGTGTGAGGCTAAGGCTGGTGGTTAAGTGGG
GAGGGGAACCAGGAATGCTGAGGGGCCAGATGAGCATATTTGAGGGCATCATTTTACAGATCATGCCATTGAGGCACAGAGAG
GAAAGGTGACTTACCSEAAGTAACACAGCAAATTCACAGCCGCTCTATGGGGTGTTCGGAGGGCCTGGGGCAGTAGTGCCATT
AACTGACCACCCAGTCCGTAATTTGGCATTGGTGGTGGTCTAGTCCATCTGTGCCTCAACCTTGGTAGGGAAAGATGAGGAAG
GAAAGGCTCAGAGAAGTAAAGTAACTAACAGAAGGTACACGGCGAGTAAGTAAACGAGGAAGGCCAAACACAAACCAAGGCA
GAGCTTGTGCTTCTGACCTAATTCTCTGCCTCTGAAGGCAAATGGCGCGTATGGGTTCCATCCATTTCTTAAGAGTAAGACTGT
GGGCACCTCGTGTGACCGCTCGAAGGTACCTTGTCCCTGATTCGTGAAATGAGATTTGCCACCTGCAGGGTTTTCTTAAGTGT
CACTCTATGGGAGGCCTGGTTTTGCAATTTCTCAGCACAGTTGTGAAATTCATGCAAATGGAAAGAAACGCACATGACCAAGA
ACCAGGCAGGTGCAGGGCGTGAGAAAAGGCTTGTTCGGTTGCACGGTGGGGGTGGGAGCGGTAGTCCACCACGCTGACACC
CCCCCTTTGGCTCAGTGGACCCTTCCCACACTTCCAACATGAGAGGCCCTCAGTGAAGGGAGATCGAATGTGCCATTTTA
GGGAGTTGGGGCCCCGGCTATGTCTGATGGGTGCTGGGTCTAGTCCCTTGTCCCCATTCCCACCCACCCCTACCTAAAG
CTTCCCAGTTGCAGCGGTGTGGCTGGGGCAGTGGGAGTGGGGCATTGGCTGCTGGAGTGGCCATCTCCAGCCGCTATAGAC
TTTGACTCTCACTTCTCAGCCCCTGAGTTCAAAGTCAGCACAAAGATCCATGAGAGGACACAGGGCTTGCTCAGACTATGCTG
ATGGAGGCAGCATGCGTGACATCTCAGCCCTGATATGAGTGTCTGTGCCCGGCTGCACCAGCGCTTTGCCCTGTGGCCCTG
CTCGACCCGCACACCAGCCCCATTGAAGCATGTGGTCAGCTGACCCTTCTTTGCAGGGCGGGGACCCAAGGCTTGAGACCTCA
CATGGCCCACTCAGACCACACATGGCCACCAGGGGCCGTTGGCTTGCCTACGGTCACAGAGCTGAGGCCGTGGCCGAGCCGAG
TCAGAACCAGGTCCGTCACGGTCCGAAAGCCAGGCTGCCCTGGCGGTCCACCCCGGTGATAAATGGGGCTGCGATGACGGTTA
TGGCCAGAAATCACCTTGGAAACCTCAGCCAGAACATCTAAACTTTGTCTCCTTTCGAATGCAGAATTAATGTGTAACGGGA
GTTCCCTAAGCCAAAGGGCCCTGGGCCCTGCCCCCTGCCACCTTCCGAGGTGGTGGGGTTCAGCGGGGGCCTCTGGGAAGGA
GGATCGCACCCCGCAGACGGCCACCCAGAGGTGAGAGGTGGGGATGCCTGGCATCTCCTTCACTGGGTTTTCTGCCTTGCTC
CTGGGCTCGGCTCCCCCTTTCATTTCTTACCAGCTGTGTGACCTCCATGGCTCATAACCCCTCTGTAGCCTCACTTTTCTTCT
GTACAAGGGGATAGTATTCCTTGTGGGCTTTCCCAGGGATTAAGTGAAGGCTGCATGGCCTTGGGTCCAGGGTATAACA
ACAGTTTACGGCTCAGAAAGCTCATCATGGGATTTTTCTCTGTGACCTCCCTCTGGCTGCCATGGGGGAGGTTTGGAGGG
GCAAGTAGGAGGTGGGACCCAGCCTGGGAGGTGAGGAGGGTGTCTCTGAAGGCAGTAGTGCAGAGGGGGTGAATGAGGGGT
TTTTGTTTTTTAATAATGGCTGCACCTGCGGCCGATGGAACCTTCCGGGCCAGAGACTGAATCCAAGCCGACGCCGACGAA
CGCTGGATCCTTTAAGGCACTTTGCGGGCCAGGGATTGAACCCGTACCTCTGCAGCAACCTGAGCCACTGCAAGCAATCAGA
TTCTTAAACCCACTGGGGCCAGTGAGAGCTCCCTGGATGTTGGGGGGGGCATTCTTTTTAAAAAATTTTTTTTATTATAGTT
GATTTACAATGTTCTGTCAATTTCTGTGTACAGCAAAGTGACCCAGTTAAACATACATATATGTGGGTGTATATATGTATGT
GTATGTATATATATGCATACATTTCTTCTTATCTTAAATCATGTTCTATACAGTGAGCGGATATAGTTCCCTGTGAAC
TCATTGCTTATCCCTTCTAAATGTGATGTTGCATCCACTAACCCAACTCCCTGTCCATCCCACCTCCAGCCCTTCC
CCTTGGCCACCCCAAGTCTGTCTCTATGTCTGTGAGTCTGTTTTCTGTTCTGAAGATAGGTTTCATTGGTGCCAGATTTTAGAG
TGCAGATAGAAGTGGTATCGTATGGTACTTGTCTTTTTTTTTCTGACTTAACTCACTTAGGATGGGAATCTCCAGTTCGGTC
CATCATGTGCAAATGGCATTATTGTGTCTTTTTCTTTTTTATTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTTTCGAGGGCCGT
ACCCACAGCATATGGAGTTCACAGGCTAGGGGGTGAATCAGAACTTCAGCCCTTGGCCTACGCCACAGCCATGCCAGATCCA
AATTGCCCTTGTGACCTACCCACAGCTCACAGCAATGTGGATCCTTAAACCACTGAGAGAGGGCCAGGGATTGAACCTGCGT
CTTCATGGATATGTGAGATTCATTTCCACTGAGCCACGACAGGAAGGCCCTTTTTGTCTTTTTTAAAGGCTGCATAGTATTC
CACTGTGCTCTGTCCACATCTTCTCATACCGACCTGCTCACTCTGGTTGCAG

CTGGT [REDACTED] CGATGCCCTGGAGGAGGAGATTGAGCACAACAAGGAGAACC CGGTCTACACACC
CCTCTACTTCCCAGAGAGCTGCACCGCCGGGCGCCCTGGAGCAGGACATGGCCTTCTGGTATGGGCCCCGCTGG CAGGAGG
CCATCCCCACAC [REDACTED] CGCTACGTGCGGCGACTGCAGCAGGTGGGGCGCTTCGAGCCGAGCTGCTGGTGGCC
CACGCCACACCCGCTAC

AT

GGTACCTGTCTGGGGCCAG [REDACTED] GTCTCAAGAAGATCGCTCAGAAGGCCCTGGACCTGCCAGCTCCGGGGAGGGCCTGGCCTT
CTTCACTTCCC[AATGTCG]CCAACGCCACCAAGTTCAAGCAGCTGTACCCTCCGAATGAACACTCTGGAGATGACCCCGG
AGGTCAAGCAGAGGGTCTCGAAGAAGCCAAGACCGC [REDACTED] TTCTCTCAAC [REDACTED] ATTACG

GTGAGGGTCTGGGCGCCAGCCGCTGCTCCAGGAATATTCCTCGTAGAGCAGGGGAGGGGACCGAGGGTACGGGTAAAGGCT
TAGGGTCTGTGCTGTGGTTCTGCCACTTACCGGCTGGGTGATCGTGGGCAGATGCCCTAATCGCCCTTTGCTTCAGTTTCCC
CACGTGCAAAATGGGGATGGAATGCTTCTTACCTCGGGGTGTGCTGAGGGTTAAGAGAGTTTGAATAACAGAGTCCCCATG
GCAGCCCTCTAACATGAGCTACTGTTCTACGGGGCGTGGTGTACCGCTGCAGCACTCTGTGACAACATAACAAGTTGTCT
GAGCGCTGTGCGCAGCCAGGTTGGCACGCCGAGGTACGGGTGCCGCAGACATGGCCTTGGGCCTCTCAGCCAGCCAGC
GGCAGGAGGCATCCTTCTACAAGCACCCAGATCCCAGGGGGTGTGTGGGCTTCGAGCCAGGCCCTGCCTTGAAGGATGACTT
CCTGGGCAGGGGCAGGGGAGGGTCCAGTGGCGGTGAGGTTCTTCTAACCCAAAAGTTGTAGAACCCCGCTCACCCT
CTCCCACCTGGAGGGCCTGTGAGGACAGCCTCCTTATGCCAGCCTGGGGCCTCAGAAGAGACTGGTCAAGGACTCTTTTTTT
TTTTTTTTTTAATTTGAGTTTTTTTTTTTTTATTATAGTTGATTTACAGTGTCTGTCAATTTCTGTGTACAGCAAAGTGGCC
AGTTACACATACATGTATACATTTTTTTTTTCTCATGTTATCTTTCATCATGTTCCAGCACAAAGTATTAGACACAGTTGCCTG
TGCTATAAAGCAGAATCTCATGGTTTATCCACTCAAATGCTACAGTTTGCATTGACTAACCCAAACTCCAGTCCATCCCA
GTCCCTCCCCCTCCCTCTTGGCAGCCACAGTTCTGTTCTCCATGTCCATGAATCTGTTTCTTTCTATAGATAGGTGCATTTA
TGCCATATTTTAGATTTCCAGGTATAAGTATATCATATGATGATTTATGCCATATTTTAGATTTCCAGGTATAAGTATATCATA
TGGTATTTATCTTTCTTCTGCTTACTTAGTATGATAACTCTACTTCTTCCGTGCTGGAATGGCATTATTTTGT
TCTTTTTTATGGCTGAGTACTATTTCCACTGTATCTGTGTTCCGCACTTCTTATCCATTCTCATCTGTCAATGGACATGTAGGT
TGTTTTCCATGTCTTGGCTATTGGGAAGAGTGTGCAGTGAACATAGGGGTGCCTGTATCTTCTTCTTTTTTTTAAAT
ATTTAAAACATTTTAAAACCATAGTTGGTTTACAATAGTCGGTCCATTTCTGCTGTGCAAGCAAAGTGACCCAGCTGTATAT
GTATCTATTTTTTTTTCCCACGTTATCTCCACTATACCACAAGTGGCTGGGTATAGTTCCCTGTGCCCTATCTTTTTCTTT
TTTTTTTTAAGCTATTTCTTGGCCTCTCCCACGGCATATGGAGGTTCCCAGGCTAGGGGTCAATCGGAGCTGTAGCCACCGG

CCTACGCCAGAGCCACAGCAATGCCAGATCCTTAACCCACTGAGCAAGGGCAGGGACCGAACCCGCAACCTCATGGTTCCTAG
TCGGATTTCGTTAACCCTGCGCCACGACGGGAACCTCCTGCCCTATCTTTTTCAATGAACGTTTTGTCTGGTTACATGCCCAGG
AGTGGGATTGCTGGATCATATGGTAGTTCTATATTCAGTTCTCTCAGGTACCTCCATACGGTTCGCCAGTGGTTGTAGCCCG
TTTATACTCCACCAACCGTGTAGGAGGTCGGAGCACTTGTAAATGGAGGGGTGCCCTTCCCTTGCATTCCTTAAAAA
AAAAATCACCCACGAAATCTGGTCTCCAGAAAAATCTGACTGTGAGAGAGGTGTTGTAGGAAGAGTGAGAGGCTCGGAGCCT
GCGCCCTTTGGAGGCTGGCTCTCGCCCTGACCTCTGGGTAGCTGGGCCCGGGGCTTCATCTCTGGGAGCTGCAGCTT
CCTCATCTGTAAAGGCTGGCTAACGAACATAGCATCACACACTACCAAGGGCGAATCTACCAAGAGAGGTGAGTGAGGACG
GCGGGCTGCAGAGTGTATACACTAGGGGACCCTCATGAAACAGCACCTGGCAGGGGACCCAGGACGGCTCTTATTGGGGAG
CATCTGGGGAGGAGCAGGCAGGCAGTGCAGATGGACTTGTGCCATCTGGTGACAGGCACACGGATGTCAGTAGTTCCTCTACG
ATTTTTTTTGTCTAATGTTTTATCACCCAGCCTTAAGCCTACCTTCAGCCAGCCTGGCACCACCTCTCACGGGGACATACCC
CTTTTGTCTTGCAAG

CTGTTTGAGGAGGTGCAGGAGCTGCTGACCCAGGACACTAAGGACCAGAGACCCTCGCAGGCATCCGACGTCCGCAAGAGGGC
CGGCAGCCGGGTGCAAG

GTGAGGGCCTCCAGGGGGTGTGTTTTCCCCGGGCTCCGTGGGAGGGCACATGGCCAGGTGGCTGGCTCCAGTATCTCTGGA
CTCTTCTGTTCCCGTGTGTTAAATGAGCAGTTGTTTTGGGGCAGGCAGAGGGCCCTGGGGCCAGCCTTCAGGGGATGACTTTAG
GCAAGCCTCAGTCTCCCCGACTCTAGAATCAGGGAAGTGGAGGAGTGAAGCTCAGACACCTGCTTAGCAGCCACCCAGGCCT
TTGCTCCTGGTCCCACCCCTTGCCACCCACCCCTGCGGCTTTCTCAGGTGTGCCAACACCACCTGGACCCCTCTGCTGGCAAGA
CTGAGGCCAGGAGTGTGAAATGTGGCCGGTCTGATGGGATTGGCTCCTGGTGGGGGTGAGGGGACTGCCTGTACACACCAG
TTTTCAAAGCGTGGCTCCCCTGGGCACCCCTGGAGGGTACTTCCCTCACAGTGTGTCTGAAAATGGAAGAATGGACAGCTTGA
GCAGTAGTAAGCTCACTGTCTTTGGAGGTATCCAAGCATTGGCTAGAGGGCTGCTCGTGGGCATGGAGCTGGGACTGTCCGAG
ACACTGCTGCGGCCCTCTGCTTTATTTTTCTGTGGCCTCTGGCCTCCAGTGTGACGTTGTCCCTTTTCTCTTTTCAG

ACTCCACTCCCGTGACAACCCCGAGGGGAAGCCGACGTCAGCGTCCCTCTCCAGGTGCCGCTCGTCCG**ATGGGTCCTGACA**
CTCAGCTTCTGGTGCAACGGTCGCCATGGGGCTTTATGCC**ATGTGAATGCAACCCGTGAATG**CAACCGTGTGGCTCCTG
GGGGCCGTGAACCTCTGCCTGGAGAGGGATGGTCTCTTACTGGCTTCCTTGTGGGCATTTGGGGTCCGGGGAGGCTCTGAG
GGCCCTGCCCTCTCCCTG**CGTCTCTCCCTCTTGCTGGAAAAAGGAGTCT**
GTGGCATCTTTCCCAACCAAGAGCACGTGCAGCCAGTGCCTGAACTTC**AGAGAGGGACAAGGGGTCCAG**CATGGCCCCCTCG
CACCTCCCCGTCCCGTTCCTGCAGCAGAGCCAGAGGATGGAGCCAGCCAGAAGCCACAGCTGTTTTCTGAGCCTCCAAACAC
CGCGGGTCCGCGTCTCCCTTTTACGTGCCTTGACTGCCTTCCCTGGGGCCGTGGCAATTTTTATAGAAGTGTGCAB**AGATG**
TTGTGTCTCGTGTTCCTGCTTGTTTTTGTTGGAGCCACTCTTCGTTCCCG
GCTCAGCCTGAACTGTGGTATTTTGTGTGTTCTGTTTTTATAGCAAGGTGGG

GTGAGGGGTGGGAGGGAGCTGTTTTAACAG

CACTGTGCCCTTGGTCACTAACTTTTATGTGAAGTAATAAAGTACATGGCCTG

(UTR oblasti, exony, introny)

Primery A: ACCCCGTCGCGAGCTGTC F
 CTCGCCCTTCTGAAAGTTCTTCAT R

Primery B: CATGGCCTCCTTGTACACATCTA F
 CTTGGTGGCCTGAGTGTAG R

Primery C: ATGTGAATGCAACCCTGTGAATG F
 GGAAAGATGCCACAGACTCCTTTT R

Primery D: ATGGGTCCTGACACTCAGCTTTCT F
 TTCCAGCAAGAGGGAGAGACG R

Primery E: AGAGAGGGACAAGGGGTCCAG F
 ACGGAAACACGAGACACAACATCT R

Primery F: GTCCTCAAGAAGATCGCTCAGAAG F
 AACAGCTGAATGTTGAGCAGGAAG R

Primery G: ATTTGTCAGAGGCCCTGAAGGAG F
 GGTTCTCCTTGTGTGCTCAATCT R

Primery H: CAGGAGGCCATCCCCTACAC F
 CGACATTGGGGAAGTGAAGAAG R

Primery I: ATTCAGCTGTTTGAGGAGGTGCAG F
 CACCAGAAAGCTGAGTGTGAGGA R

Primery J: CCAGACTGTCTCCAAGGATCAGAG F
 TGGCTCATGATAAGGCTGTTGTTT R

Primery K: ATTGCCATGAACTGTGGTGTAGGT F
 GGGAGCCTAAATGACAAAACGAAC R