

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

Ústav patologické fyziologie

Mgr. Kateřina Bogdanová

**OVLIVNĚNÍ SIGNALIZAČNÍ KASÁDY NF- κ B A PPAR γ
ENERGETICKÝMI SUBSTRÁTY**

Doktorská dizertační práce

Školitelka: MUDr. Dagmar Riegrová, CSc.

Olomouc 2009

Tímto bych velice ráda poděkovala MUDr. Dagmar Riegrové, CSc. za cenné rady, pečlivé konzultace a trpělivý přístup po celou dobu práce. Ráda bych také poděkovala pracovníkům Ústavu patologické fyziologie na Teoretických ústavech LFUP, zejména vedoucímu ústavu Prof. MUDr. Jaroslavu Veselému, CSc. a RNDr. Miroslavu Rypkovi, CSc. za pomoc v experimentální části práce.

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala sama pod vedením školitele MUDr. Dagmar Riegrové, CSc. a s použitím literatury, kterou cituji v závěru práce.

V Olomouci dne

.....

Mgr. Kateřina Bogdanová

OBSAH

A. Úvod dizertační práce	7
B. Literární přehled	11
B.1. Regulace metabolismu na úrovni transkripčních faktorů.....	11
B.1.1. Transkripční faktory – jaderné receptory.....	13
B.1.1.1. Jaderné receptory PPAR.....	14
B.1.1.2. Koaktivátory jaderných receptorů.....	16
B.1.1.2.1. PPAR γ koaktivátory-1 (PGC-1).....	17
B.1.1.2.2. Jednotliví členové rodiny PGC-1.....	20
B.1.2. Transkripční faktor NF- κ B.....	23
B.1.2.1. Členové rodiny NF- κ B/Rel.....	24
B.1.2.2. Geny transaktivované NF- κ B.....	26
B.1.2.3. Aktivace NF- κ B signalizační kaskády.....	27
B.1.2.3.1. IKK kinázy.....	28
B.1.2.3.2. Inhibiční proteiny skupiny I κ B.....	29
B.1.2.4. Spojitost signalizační kaskády NF- κ B s některými typy onemocnění.....	31
B.1.2.4.1. Oxidační stres a NF- κ B.....	31
B.1.2.4.2. Zánětlivá onemocnění a NF- κ B.....	32
B.1.2.4.3. Další typy onemocnění.....	35
B.1.2.4.4. Terapeutické využití inhibice složek signální cesty NF- κ B.....	37
C. Cíle dizertační práce	40
D. Materiály a metodika	42
D.1. Použité buněčné linie.....	42
D.2. Buněčná frakcionace.....	42
D.3. Imunoblotting.....	43
D.4. Kvantitativní RT-PCR (Real-Time polymerase chain reaction).....	44

D.5. Statistické hodnocení.....	45
E. Výsledky.....	46
E.1. Zavedení metody frakcionace na cytosol/jádra.....	46
E.2. Stanovení vlivu glykosilovaného albuminu na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B na základě jejich buněčné lokalizace cytosol/jádro.....	47
E.3. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B na základě jejich buněčné lokalizace cytosol/jádro.....	49
E.4. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na transkripční faktory PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátory PGC-1 α a PGC-1 β	51
E.5. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na syntézu proteinů <i>de novo</i>	54
E.6. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na stabilitu mRNA transkripčních faktorů PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátorů PGC-1 α a PGC-1 β	56
F. Diskuze.....	62
F.1. Stanovení vlivu glykosilovaného albuminu na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B na základě jejich buněčné lokalizace cytosol/jádro.....	62
F.2. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B na základě jejich buněčné lokalizace cytosol/jádro.....	64
F.3. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na transkripční faktory PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátory PGC-1 α a PGC-1 β	66

F.4. Vliv nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na <i>de novo</i> proteinovou syntézu a mRNA stabilitu transkripčních faktorů PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátorů PGC-1 α a PGC-1 β	69
G. Souhrn dizertační práce.....	72
G.1. Úvod.....	72
G.2. Cíle dizertační práce.....	72
G.3. Materiály a metodika.....	72
G.4. Výsledky a závěry.....	73
G.5. Klíčová slova.....	75
H. Summary	76
H.1. Introduction.....	76
H.2. Aims.....	76
H.3. Materials and methods.....	76
H.4. Results and conclusions.....	77
H.5. Keywords.....	79
I. Seznam použité literatury.....	80
J. Seznam použitých zkratk.....	108
K. Seznam publikovaných prací.....	111

A. Úvod dizertační práce

Díky rozvoji molekulárního výzkumu posledních několika let se podstatně rozšířily vědomosti o řízení energetického metabolismu na úrovni signalizačních kaskád. Za hlavní faktory podílející se na regulaci energetického metabolismu se dříve považovaly hormonální regulace a energetický stav buňky.

Skupina regulačních faktorů působících na buněčné úrovni se rozšířila o nutrienty. Glukóza, volné mastné kyseliny a aminokyseliny mohou zasahovat do řízení metabolismu buňky nejen jako zdroje energie (Desvergne et al. 2006). Sacharidy a lipidy mají mnoho strukturních a metabolických funkcí, ale především jsou základními zdroji energie obsažené v potravě.

Současnou dobu provází, a to nejen ve vyspělých zemích, trend příjmu nepřiměřeného množství vysokoenergetické stravy bez vyvažujícího faktoru odpovídající fyzické námahy. Výsledkem je nadměrné hromadění energetických zásob v organizmu ve formě tuků vedoucí k obezitě. Příčiny obezity bývají většinou komplexní. Často se uplatňuje nejen zmíněný vyšší energetický příjem spolu s nedostatkem fyzické aktivity a dědičná dispozice, ale i způsob výživy v dětství, hormonální nerovnováha, poruchy regulace pocitu sytosti na úrovni hypotalamu a podobně. Zcela výjimečně je obezita monofaktoriálním onemocněním. Nadbytek tukové tkáně zvyšuje zdravotní rizika a zkracuje statisticky stanovenou délku života.

Obezita se stává epidemií a v některých vyspělých zemích dosáhla alarmujících rozměrů. V roce 2007 WHO (World Health Organization) stanovila počet lidí s nadváhou na 1,7 miliard, z toho alespoň 155 miliónů dětí s nadváhou nebo obezitou (Haslam et James 2005). Je alarmující, že se počet obézních jedinců za posledních dvacet let ztrojnásobil. Tato skutečnost se vztahuje na vyspělé země jako následek tzv. západního způsobu života, tj. málo pohybu a velký příjem kalorické stravy (Hossain et al. 2007).

Nadváha a obezita se značnou měrou podílejí na rozvoji metabolického syndromu. Jako metabolický syndrom se označuje soubor symptomů asociovaných s inzulínovou rezistencí. U osob trpících metabolickým syndromem je vyšší pravděpodobnost vzniku diabetu druhého typu

(Laaksonen et al. 2002; Lorenzo et al. 2003) a poruch kardiovaskulárního systému (Isomaa et al. 2001; Wassink et al. 2007).

Současná kritéria klasifikace metabolického syndromu jsou založena na splnění tří a více z následně uvedených parametrů. Hodnoty krevního tlaku $>130/85$ mmHg; glukózy měřené nalačno $> 11\text{g/l}$; plazmových triglyceridů $> 15\text{g/l}$; hodnota HDL (high-density lipoprotein) cholesterolu $< 4,5\text{g/l}$ (muži), < 5 g/l (ženy); obvodu pasu > 102 cm (muži), > 88 cm (ženy). Jako další možný parametr metabolického syndromu se nyní monitorují vyšší hladiny některých proteinů akutní fáze, např. C - reaktivního proteinu (Virgin et Schmitke 2003).

U obézní populace dochází ke zvýšenému ukládání tuku zejména v podkoží abdominální oblasti. Z hlediska metabolického syndromu je však významná zejména kumulace viscerální tukové tkáně (Bergman et al. 2006). V této souvislosti je uváděna tzv. portální teorie, podle které je za vznikem inzulínové rezistence a jejích doprovodných komplikací vysoká hladina volných mastných kyselin putujících přes portální vėnu z viscerální tukové tkáně do jater. Následkem je zvýšená jaterní glukoneogeneza, redukce jaterní inzulínové clearance a výsledná inzulínová rezistence (Kabir et al. 2005). Dochází k potlačení vlivu inzulínu na glykogenolýzu, glukoneogenezu a lipolýzu, k hyperglykémii, hyperinzulinémií a nealkoholické steatóze jater (Fernandez 2007).

V plazmě pacientů s inzulínovou rezistencí a diabetem druhého typu jsou běžným jevem postprandiálně zvýšené hladiny triglyceridů, které přispívají k riziku vzniku aterosklerózy a jiných metabolických onemocnění. Zvýšení hladiny cirkulujících triglyceridů a volných mastných kyselin přispívá spolu se změnami v jejich metabolismu ke komplikacím doprovázejícím obezitu a metabolický syndrom. Dochází ke zvýšenému vychytávání a sekundárnímu ukládání tuků ve tkáních, jako jsou například játra či kosterní svalstvo (Boden et Shulman 2002).

V kosterním svalstvu dochází k rozvoji inzulínové rezistence, která se projevuje inhibicí inzulínem stimulovaného příjmu glukózy buňkami a syntézy glykogenu mechanismem zahrnujícím intracelulární akumulaci diacylglycerolu. Inzulínová rezistence kosterního svalstva přispívá k *de novo* syntéze triglyceridů v játrech a zvyšuje tak jejich koncentraci v plazmě (Petersen et al. 2007).

Bylo prokázáno, že zvýšené hladiny volných mastných kyselin mohou aktivovat signalizační kaskádu NF- κ B (nuclear factor – kappa B). Některé z genů, jejichž transkripce je aktivována touto kaskádou, jsou zapojeny do tkáně poškozujících zánětlivých procesů. Patologicky vysoké koncentraci mastných kyselin se nepřičítá pouze podíl na inzulínové rezistenci jater a kosterního svalstva, ale i podíl v patogenezi onemocnění kardiovaskulárního systému (Boden 2003).

Chronická hyperglykémie, která je jedním z hlavních, ale bohužel ne jediným z rizikových faktorů doprovázejících DM (I. i II. typu), mimo jiné vede k formaci a kumulaci meziproduktů a produktů pokročilé glykace - AGEs (advanced glycation end products). Ty vznikají neenzymatickou reakcí mezi volnými $-NH_2$ skupinami proteinů a glukózou (Zhang et al. 2006).

Výsledky studií např. (Vlassara 2005) naznačují úzkou spojitost mezi vysokými hladinami glykosilovaných proteinů a produkcí volných kyslíkových radikálů (ROS). Ty se podílejí na vzniku četných chronických diabetických komplikací, jako je např. poškození cév na makro i mikrovaskulární úrovni. Předpokládá se, že mechanismus vzniku volných kyslíkových radikálů se rovněž podílí na aktivaci signalizační kaskády transkripčního faktoru NF- κ B (De Oliveira et al. 2005). NF- κ B je ve své neaktivní formě připojen k inhibičnímu proteinu I κ B (inhibitor of kappa B). Působení volných kyslíkových radikálů vede k jeho aktivaci odpojením od inhibičního proteinu I κ B α translokací do jádra, kde spouští transkripci příslušných genů (Kabe et al. 2005). A to včetně genů prozánětlivých, které se poté podílejí mimo jiné na chronických komplikacích diabetu.

Jak již bylo výše zmíněno, mastné kyseliny a glukóza mohou spolu s dalšími nutrienty působit jako univerzální regulátoři expresních mechanismů genů celé řady proteinů, které zpětnovazebně hrají důležitou roli v jejich metabolismu. Během posledních několika let se prokázalo, že kontrola genové exprese za pomoci zmíněných nutrientů a jejich metabolitů představuje doplňkový mechanismus již známé hormonální regulace buněčného metabolismu (Desvergne et al. 2006). To umožňuje buňkám rozšířit možnosti adaptačních reakcí na aktuálně kladené energetické nároky i na rozdílnost nabídky energetických zdrojů.

Působení volných mastných kyselin na transkripční faktory vážící se na DNA, jako jsou PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) $-\alpha$, $-\beta$ a $-\gamma$, pravděpodobně představuje molekulární základ mostu spojujícího mastné kyseliny, glukózu a regulaci genové exprese (Duplus et Forest 2002). Tyto regulační molekuly vyskytující se v jádře mohou na základě podnětu lipidového charakteru kontrolovat řadu genů zapojených do metabolismu lipidů (Semple et al. 2006).

Poslední studie transkripčních mechanismů dále prokázaly přítomnost na ligandu nezávislých molekul působících jako koaktivátory transkripce a nezbytných pro aktivaci transkripčních faktorů. V případě transkripčních faktorů PPAR se jedná o koaktivátory PGC-1 α a -1 β (Finck et Kelly 2006; Lin et al. 2005). Tyto molekuly jsou citlivé mimo jiné na změny hladin glukózy a mastných kyselin a jsou zapojeny do jejich regulace. Je pravděpodobné, že poruchy v expresi a v signalizační funkci PPAR/PGC mohou přispívat ke vzniku hyperglykémie závažné zejména u diabetiků či k rozvoji jaterní steatózy nejen u obézních lidí.

Pochopení vztahů mezi mastnými kyselinami, glukózou a transkripčními faktory NF- κ B a PPAR jejich koaktivátory, je velmi důležité. A to nejen u fyziologicky probíhajících procesů, ale zejména u patofyziologických stavů. Možnost alespoň minimálního ovlivnění regulačních mechanismů na molekulární úrovni by signalizovala optimistický směr vývoje terapie multifaktoriálně podmíněných metabolických chorob, k nimž obezita a diabetes mellitus patří. Nové poznatky by mohly přispět k ozdravení dnešní i následujících populací a současně se pozitivně odrazit snížením nákladů na zdravotní péči.

B. Literární přehled

Buněčný metabolismus je komplikovaný děj kontrolovaný na celé řadě úrovní. Velice důležitá je regulace na úrovni transkripce pomocí tzv. transkripčních faktorů, jejich koaktivátorů a jiných proteinů zasahujících do transkripční aktivity, jako jsou např. inhibiční proteiny. Následující literární přehled popisuje jednotlivé transkripční faktory sledované v předkládané práci, jejich koaktivátory a inhibitory, charakterizuje jejich základní vlastnosti a funkce v různých tkáních, případně jejich účast na vzniku různých metabolických, zánětlivých a nádorových onemocnění.

B.1. Regulace metabolismu na úrovni transkripčních faktorů

Regulace na úrovni transkripce je řízena signály, které regulují jadernou expresi specifické skupiny genů. Exprese genů kódujících určité proteiny je v eukaryotech vysoce organizovaný a propracovaný proces. Je životně důležité, aby exprese specifických genů probíhala na základě fyziologických potřeb buňky v závislosti na buněčném cyklu či působení signálů z vnějšího prostředí. Následky disregulace mohou být velice nebezpečné – zvýšená apoptóza či nádorové bujení.

Ve většině eukaryotických buněk a buněčných typech mnohobuněčného organismu se vyskytují obecné transkripční faktory (GTFs; general transcription factors). Jsou potřebné pro transkripci genů, přesné umístění promotoru transkribovaných genů, rozvinutí DNA a převedení iniciace transkripce do fáze elongace RNA (Orphanides et al. 1996; Roeder 1996). Obecné transkripční faktory odpovídají za bazální metabolismus buňky. Geny na jejichž transkripci se účastní se nazývají provozní, zajišťují bazální buněčné požadavky.

Transkripce mnoha genů však vyžaduje přítomnost speciálních transkripčních faktorů, které se váží na specifické sekvence. Jak jsou transkripční faktory důležité je možno potvrdit vztahem mezi narušením jejich fyziologických funkcí a některými významnými metabolickými

poruchami. Tyto transkripční faktory mají tkáňové a časové určení, napomáhají při buněčné diferenciaci a jsou indukovatelné. Po napojení na klíčový promotor pomáhají s navázáním zesilovačů transkripce, které se často mohou nacházet až několik kilobází daleko od promotoru a indukují aktivaci – vyjimečně inhibici – transkripce. Transkripce genů v buňce je pak výsledkem kombinace působení obecných a speciálních transkripčních faktorů.

Kontrola metabolismu, která v buňce probíhá na úrovni transkripce, se může dělit do tří navazujících dějů:

- 1) děje v signalizační kaskádě nad aktivací transkripce, které zahrnují účastníci se signály a jejich přenos do jádra;
- 2) molekulární mechanismy řízené transkripčními faktory;
- 3) děje následující transkripční aktivaci, které jsou závislé na tom, které geny byly transkribovány a na dalších signálech, jejichž cílem je nastolení dynamické rovnováhy v buňce.

Eukaryotické speciální transkripční faktory běžně obsahují jisté domény, které jednak řídí navázání na specifickou DNA-sekvenci a také, po vazbě na zesilovače transkripce, umožňují seskupení všech potřebných složek transaktivačního soukolí v blízkosti promotoru na základě protein-proteinové interakce (Mitchell 1989). Podobnými mechanismy působí i represní domény inhibitorů, které v konečném důsledku vyvolají snížení či zastavení činnosti transkripčního aparátu (Renkawitz 1990).

Transkripční faktory však nejsou jedinými modulátory aktivace/inhibice transkripce. Stejně důležité jako transkripční faktory jsou mnohé intermediální proteiny a proteinové komplexy, tzv. koregulátory, které mohou transkripčním faktorům navázaným na DNA pomoci zprostředkovat jejich signál. Tyto proteiny mají schopnost potlačit – korepresory, nebo podpořit – koaktivátory aktivitu genů regulovaných jadernými receptory. (Dymlacht et al. 1991; Spiegelman et Heinrich 2004; Rosenfeld et al. 2006; Feige et Auwerx 2007).

Kofaktory jsou charakteristické schopností interakce se širokou škálou různých transkripčních faktorů a schopností vytvořit proteinový komplex transkripčního efektoru. Mnoho signalizačních kaskád má za cíl aktivaci kofaktorů, příkladem může být fosforylace CBP (CREB-binding protein) po přijetí signálu zprostředkovaného inzulinem, nebo PGC-1 (PPAR γ

coactivator-1). Byly však také popsány alternativní signalizační dráhy, které aktivují koregulátory nezávisle na přítomnosti jakéhokoliv ligandu.

B.1.1. Transkripční faktory – jaderné receptory

Jaderné receptory jsou transkripční faktory charakteristické dvěma důležitými vlastnostmi:

- 1) jsou aktivovány po navázání specifického ligandu,
- 2) váží se pomocí DNA-vazebné domény na specifický responzivní element umístěný v blízkosti promotoru cílových genů těchto receptorů.

Ve stručnosti se dá říci, že hlavní funkcí jaderných receptorů v dané buňce je upravit její genovou expresi na základě signálů přijímaných ve formě specifických ligandů.

Výzkum v poslední dekádě odhalil tři mechanismy regulující činnost jaderných receptorů. Jedná se o dostupnost heterodimerických partnerů jaderných receptorů, jejich posttranslační modifikace a regulaci na úrovni endogenních ligandů (Finck et Kelly 2006).

V nepřítomnosti ligandu mohou být jaderné receptory navázány na korepresorový protein, který potlačuje jejich funkci. Korepresor je uvolněn přítomností ligandu, nebo alternativní cestou aktivace např. fosforylací. Na jaderném receptoru se tak uvolní místo pro navázání koaktivátoru. Vzniklý komplex pak může reagovat s komplexem iniciujícím transkripci. Korepresory a koaktivátory zasahují do řízení transkripčních dějů svojí schopností ovlivňovat stav chromatinu acetylací a deacetylací histonů, případně jejich metylací.

Analýzy lidského genomu vedly k identifikaci 48 genů kódujících jaderné receptory, z nichž každý dává vzniknout alespoň jedné receptorové izoformě. Na základě vazebných vlastností jejich specifických ligandů jsou jaderné receptory děleny do tří skupin.

1) jaderné receptory s ligandami hormonálního charakteru dohromady vytvářejí nadrodinu zahrnující klasické steroidní receptory (androgeny, estrogeny, glukokortikoidy, mineralokortikoidy a progesteronové receptory), tyroidní, retinoidní receptory, receptory vitamínu D a mnoho dalších popsaných v nedávné době. Jejich aktivace hraje klíčovou roli v udržování endokrinní homeostázy (Egea et al. 2000),

2) tzv. orphan (sirotčí) receptory, které se vykazují strukturálními vlastnostmi charakteristickými pro jaderné receptory, dosud však nebyl identifikován žádný jejich ligand (Wang et al. 2003) a funkce některých těchto receptorů zůstává zatím neznámá,

3) receptory působící jako senzory metabolismu. Tyto receptory váží substráty, meziprodukty či konečné výsledky metabolických reakcí, jako jsou mastné kyseliny, eikosanoidy a oxysteroly. To znamená, že reagují na aktuální stav metabolismu, a regulují adaptaci metabolismu na mnoha úrovních. Do této skupiny patří receptory, jako HNF4 α (hepatic nuclear factor 4 α) a skupina PPAR (peroxisome proliferator activated receptor), a v metabolismu cholesterolu působící LXR (liver X receptor) a FXR (farnesoid X receptor) (Jump 2002).

Aktivované jaderné receptory navázané na DNA váží na principu protein-proteinové interakce obecné transkripční faktory nebo faktory působící jako prostředníci – koaktivátory. Jedná se často o podjednotky proteinových komplexů stabilizujících preiniciační komplex, obsahující např. RNA polymerázu (Wärnmark et al. 2003).

Jako molekuly silně zapojené do metabolických procesů a ontogeneze mohou jaderné receptory představovat potenciální terapeutické cíle u řady onemocnění, např. rakoviny, srdečních onemocnění, endokrinních a metabolických poruch (Kliwer et al. 2001; Chawla et al. 2001; McDonnell et al. 2002).

B.1.1.1. Jaderné receptory rodiny PPAR

Při prvních pokusech s látkou zvanou klofibrát, vyvinutou za účelem snížení hladin lipidů, byl u pokusných zvířat zaznamenán nárůst peroxisomů. Receptor aktivovaný klofibrátem byl posléze klonován a nazván PPAR α (NR1C1) (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) (Thorp et Waring 1962; Hess et al. 1965; Issemann et Green 1990). Následně byly identifikovány jeho strukturální homologové PPAR β/δ (NR1C2, NUC1, FAAR) a PPAR γ (NR1C3), rovněž kontrolující expresi genů zapojených do metabolismu, ale na rozdíl od PPAR α bez schopnosti indukce proliferace peroxisomů (Graves et al. 1992; Dreyer et al. 1992; Schmidt et al. 1992). Je zajímavé, že si organizmus dokázal vytvořit citlivě regulovanou rovnováhu oxidace mastných

kyselin v játrech a ostatních tkáních a ukládání lipidů v tukové tkáni, na které svou činností podílejí PPAR α (oxidace) a PPAR γ (ukládání lipidů) (Desvergne et al. 2006).

Všichni členové PPAR podrodiny jaderných receptorů vytvářejí heterodimery s RXR (retinoid X receptor), které se váží k responzivním elementům PPRE (peroxisome proliferator response elements) cílových genů (Mangelsdorf et Evans 1995). Po navázání ligandu se k PPAR připojí koaktivátory, většinou organizované do velkých komplexů. Vazba může být izotypově závislá. Zajišťuje tak specifitu aktivace cílových genů (Surapureddi et al. 2002).

Jako ligandy PPAR mohou působit mastné kyseliny (zejména nenasycené) a některé eikosanoidy odvozené od kyseliny arachidonové a linolenové (Gonzalez et al. 1998). Tyto molekuly se váží k jednotlivým PPAR s různou afinitou. PPAR α kromě mastných kyselin, které jsou jeho hlavními přirozenými ligandy, reaguje se syntetickými hypolipidemickými fibráty či amfipatickými karboxylovými kyselinami, herbicidy, antagonisty receptoru leukotrienu D₄ a dalšími (Gonzalez et al. 1998; Reddy et Lalwai 1983). Jaterní PPAR α je stimulován za stresových podmínek a v závislosti na cirkadiálních rytmech – reaguje na hladinu glukokortikoidů v plazmě (Lemberger et al. 1996).

PPAR α je exprimován ve tkáních s vysokým stupněm oxidace mastných kyselin jako jsou játra, hnědá tuková tkáň, ledviny, srdce a kosterní svalstvo (Braissant et al. 1996; Auboeuf et al. 1997), dále v monocytech, cévním endotelu a myocytech hladké svaloviny (Chinetti et al. 1998, Inoue et al. 1998; Staels et al. 1998).

PPAR β se vyskytuje ve všech tkáních bez rozdílu, ve vyšších koncentracích pak v mozku, kůži a tukové tkáni (Braissant et al. 1996; Inoue et al. 1998). I když je o funkci tohoto typu PPAR známo méně, jsou jisté náznaky o jeho funkci při implantaci embrya (Lim et al. 1999), diferenciaci a proliferaci kůže (Peters et al. 2000; Michalik et al. 2001; Tan et al. 2001), proliferaci pre-adipocytů (Hansen et al. 2001) a jako modulátoru aktivity PPAR α a PPAR γ (Jow et Mukherjee 1995; Shi et al. 2002). U myši s nefungujícím PPAR β byly pozorovány změny kůže a podkoží, změny související s myelinizací a tvorbou tukových zásob, změny vytváření placenty a zvýšení embryonální letality (Peters et al. 2000; Michalik et al. 2001; Barak et al. 2002).

U lidí byly identifikovány tři různé PPAR γ mRNA označované PPAR γ 1, PPAR γ 2 a PPAR γ 3 (Fajas et al. 1997; Fajas et al. 1998). PPAR γ 2 je forma exprimovaná téměř výhradně v adipocytech, kde se pomocí interakce s jinými transkripčními faktory, např. ADD-1/SREBP-1c (adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element-binding protein) či C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein), podílí na jejich diferenciaci (Auboeuf et al. 1997; Vidal-Puig et al. 1997; Tontonoz et al. 1994; Kim et Spiegelman 1996; Fajas et al. 1999).

PPAR γ 1 a PPAR γ 2 se liší pouze v jejich N-koncové oblasti. PPAR γ 2 je delší o 28 aminokyselinových zbytků (Fajas et al. 1997) a exprese mRNA je řízena alternativním promotorem. Obě izoformy sdílejí stejnou ligand-vázající doménu (LBD) a jsou aktivovány mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem, prostanoidy a antidiabetickými léčivými - thiazolidinediony (Spiegelman et Flier 1996; Kubota et al. 1999; Kersten 2001). PPAR γ 1 je ve vysoké míře exprimován v tukové tkáni, tlustém střevě a buňkách krevetvorby, v malém množství pak v ledvinách, játrech, kosterním a hladkém svalstvu, slinivce a tenkém střevě (Auboeuf et al. 1997; Iijima et al. 1998; Loviscach et al. 2000; Dubois et al. 2000). PPAR γ 2 exprese je omezena na bílou tukovou tkáň. PPAR γ 3 byl zatím detekován zejména v tlustém střevě a makrofázích a adipocytech (Fajas et al. 1998).

Na modelech obezích nebo diabetických zvířat byla pozorována suprafyziologická exprese PPAR γ (Edvardsson et al. 2006; Kajita et al. 2003; Schadinger et al. 2005). Rovněž se předpokládá jeho účast na vzniku hepatosteatózy u lidí (Nakamuta et al. 2005). PPAR γ 2 varianta je dominantní u lipoatrofických myší a vyšší exprese byla pozorována v hepatocytech myší po ovlivnění vysokou dávkou kyseliny olejové a/nebo inzulínem (Gavrilova et al. 2003; Edvardsson et al. 2006).

B.1.1.2. Koaktivátory jaderných receptorů

Neustále nalézáme nové poznatky týkající se způsobů, jakým eukaryotické buňky řídí aktivitu svých genů. Dřívější studie prokázaly, že mezi steroidními receptory patřícími do různých receptorových podrodin může docházet ke vzájemné interferenci v aktivaci transkripce. Uvažovalo

se o možnosti existence limitujících faktorů, o které by steroidní receptory navzájem soupeřily, a které by měli jistý vliv na funkci zesilovačů (enhancerů) transkripce (Meyer et al. 1989; Bocquel et al. 1989).

Existence limitujících faktorů byla později potvrzena a dnes jsou známé jako tzv. koaktivátory transkripce. Jedná se o skupinu různorodých buněčných faktorů, které působí jako transkripční mediátory.

Koaktivátory můžeme dělit z hlediska funkcí v aktivaci transkripce. V první řadě jsou adaptorovými proteiny, které umožňují spojení aktivátorů transkripce, vázajících se na sekvenčně specifická místa DNA, s obecným transkripčním mechanismem.

Druhou funkcí koaktivátorů je enzymatickou modifikací (jedná se zejména o histonové acetyltransferázy a deacetylázy) či remodelováním měnit vlastnosti chromatinového vlákna, které s různou intenzitou působí jako inhibitor přístupu proteinů k DNA (Grundstein 1997; Pazin et Kadonaga 1997; Workman et Kingstone 1998; Brown et al. 2000).

Fyziologická reakce buněk na různé stimuly může být rovněž limitována dostupností koaktivátorových proteinů potřebných pro aktivaci jaderných receptorů řídících transkripci specifických genů. Dobrým příkladem charakterizujícím tento mechanismus jsou koaktivátory rodiny PPAR γ -1 (PGC-1) (Finck et Kelly 2006).

Seznam proteinů, které mohou působit jako receptor-interagující faktory se v posledních dvou letech značně rozrostl a zdaleka není konečný. Důležité je rovněž zjištění, že i když existuje řada různých koaktivátorových komplexů, mnoho podjednotek se shoduje a jejich sestavování probíhá podle určitých pravidel. Buňka je tak zásobena stavebními bloky, které se do různých komplexů kombinují na základě okamžitých potřeb.

B.1.1.2.1. PPAR γ koaktivátory-1 (PGC-1)

Členové rodiny PPAR γ -koaktivátorů plní svou úlohu v regulaci metabolismu jako koregulátory jaderných receptorů reagujících na nutriční podněty kontrolou transkripce odpovídajících genů. PGC-1 patří mezi koaktivátory jejichž exprese je tkáňově specifická a jejichž

indukce probíhá pouze v reakci na konkrétní signály. mRNA těchto koaktivátorů se nachází ve tkáních typicky vysokými energetickými nároky a s tím souvisejícím vyšším počtem mitochondrií, jako jsou srdeční svalovina, kosterní svalstvo, hnědá tuková tkáň, ledviny, játra a mozek (Puigserver et al. 1998; Esterbauer et al. 1999; Knutti et al. 2000). Na základě zvýšených metabolických nároků je pak stimulována jejich exprese.

Tkáně s vysokými energetickými nároky samozřejmě vyžadují zesílený přísun oxidovatelného paliva a jeho utilizaci. V tomto ohledu se funkce PGC-1 realizují v podobě aktivace exprese transportního proteinu glukózy GLUT4 (glucose transporter) koaktivací transkripčního faktoru MEF-2c (myocyte enhancer factor-2c) v buňkách svalové tkáně (Micheal et al. 2001). Je pravděpodobné, že se PGC-1 podílí na glukoneogenezi v játrech (Sapolsky et al. 2000), či oxidaci mastných kyselin a ketogenezi (Lemberger et al. 1994). Jedněmi z cílových jaderných receptorů PGC-1 jsou ERRs (estrogen-related receptors). Člen rodiny ERRs - $ERR\alpha$ – je důležitým regulátorem mitochondriální oxidativní fosforylace a oxidace mastných kyselin. Navíc zasahuje do exprese NRF-1, NRF-2 (nuclear respiratory transcription factor-1, -2) a $PPAR\alpha$, teoreticky tak může amplifikovat působení jejich koaktivátoru - $PGC-1\alpha$ (Huss et al. 2002; Schreiber et al. 2003).

Z ligandů PGC-1 koaktivátorů podílejících se na regulaci jiných než mitochondriálních metabolických kaskád byly zatím identifikovány např. HNF-4 (hepatic nuclear factor-4) (Rhee et al. 2003) anebo FOXO1 (forkhead box O1) podílející se na procesu glukoneogeneze (Puigserver et al. 2003), MEF-2 (myocyte enhancer factor-2) zapojený do transportu glukózy (Michael et al. 2001), SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein-1) ovlivňující lipogenezi (Lin et al. 2005) anebo Sox9 (sry-related HMG box-9) zapojený do procesu chondrogenese (Kawakami et al. 2005). Tyto transkripční faktory s výjimkou HNF-4 nejsou jadernými receptory.

Kromě interakcí s výše jmenovanými receptorovými i nereceptorovými transkripčními faktory mohou PGC-1 koregulovat funkci dalších jaderných receptorů, např. $PPAR\alpha$ (Vega et al. 2000), $PPAR\beta$ (Wang et al. 2003), GR (glucocorticoid receptor) (Knutti et al. 2000), THR (thyroid hormone receptor), MR (mineralocorticoid receptor), receptory retinoidů (Puigserver et al. 1998), FXR (farnesyl X receptor) (Zhang et al. 2004), PXR (pregnane X receptor) (Bhalla et al. 2004),

LXR (liver X receptor) (Lin et al. 2005) a receptor estrogenu (ER) (Puigserver et al. 1998; Knutti et al. 2000; Tcherepanova et al. 2000).

Na expresi genů indukovaných koaktivátorem PGC-1 se může podílet více transkripčních faktorů v závislosti na momentálních metabolických požadavcích. Příkladem je „naverbování“ PGC-1 jaderným receptorem PPAR γ a indukce UCP-1 (uncoupling protein-1) v hnědé tukové tkáni v reakci na přísun vysoce energetické potravy (Vidal-Puig et al. 1996). Zatímco v případě potřeby produkce tepla z důvodu podchlazení je partnerem koaktivátoru tyroidní receptor (THR) (Himms-Hagen 1990; Branco et al. 1999).

PGC-1 není zapojen pouze do regulace energetického metabolismu. Jeho schopnost interagovat se steroidními receptory GR a MR naznačuje pravděpodobnost, že tento koaktivátor může zasahovat i do reakcí organismu na stres (Sapolsky et al. 2000).

PGC-1 koaktivátor obsahuje ve své struktuře celou řadu proteinových domén, které mu umožňují interakci s DNA vazebnými transkripčními faktory a efektorovými proteiny signalizační kaskády. Na N-konci proteinu se nachází doména bohatá na aminokyselinu leucin, která umožňuje na ligandu závislou vazbu s jadernými receptory PPAR α , GR a ER (estrogen receptor) (Vega et al. 2000; Tcherepanova et al. 2000; Knutti et al. 2001). Oblast reagující s pantovou oblastí receptoru PPAR γ a DNA-vazebnou doménou transkripčního faktoru NRF-1 je pro změnu bohatá na prolin (Puigserver et al. 1998; Wu et al. 1999; Puigserver et al. 1999).

N-koncová oblast PGC-1 koaktivátorů reaguje s enzymy s funkcí histonové acetyltransferázy, jako jsou CBP (CREBP-binding protein) a SRC-1 (steroid receptor coactivator-1), která remodeluje chromatinové histony (Puigserver et al. 1999). Usnadní se tak přístup transkripčního komplexu k cílovým genům.

Silná transaktivační doména na N-konci PGC-1 slouží jako místo pro navázání transkripčního komplexu RNA polymerázy II.

Na C-konci koaktivátoru se pak nachází vazebné domény, např. pro složky spliceosomu obsahující domény bohaté na aminokyselinové zbytky serinu a argininu, které napomáhají určit

místa sestřihu primárního transkriptu pre-mRNA při posttranskripčních modifikacích (Monsalve et al. 2000).

Celkově tak PGC-1 mohou pravděpodobně zasahovat do fází sestavení preiniciačního a následně iniciačního komplexu RNA polymerázy II, elongační fáze i následných posttranskripčních úprav (Knutti et Kralli 2001).

B.1.1.2.2. Jednotliví členové rodiny PGC-1

Jako první člen této rodiny byl popsán PGC-1 α , který plní roli koaktivátoru jaderného receptoru PPAR γ v hnědé tukové tkáni (Puigserver et al. 1998), která funguje jako termoregulační orgán se schopností produkovat teplo netřesovou reakcí rozpážením oxidativní fosforylace ve velkém množství mitochondrií, které je pro tuto tkáň charakteristické. Následoval objev dvou dalších příbuzných koaktivátorů: PGC-1 β , také nazývaný PERC (PGC-1-related estrogen receptor coactivator), a PRC (PGC-1-related coactivator) (Andersson et al. 2001; Lin et al. 2002; Kressler et al. 2002).

PGC-1 α a PGC-1 β jsou převážně exprimovány ve tkáních s vysokým stupněm oxidace a vysokými energetickými nároky, jako jsou výše zmíněná hnědá tuková tkáň, dále srdeční a kosterní svalstvo (pomalá vlákna). Jejich působení se týká hlavně mitochondriálního metabolismu (Puigserver et al. 1998; Lin et al. 2002; Wu et al. 1999; Kamei et al. 2003; St-Pierre et al. 2003). PGC-1 α se pak ve vyšších koncentracích nachází ještě v mozku a ledvinách. K jeho zvýšené expresi v srdeční tkáni dochází zejména po porodu při biogenezi mitochondrií a přechodu na ATP energetické zdroje z oxidace mastných kyselin (Lehman et al. 2000), dále při zvýšené zátěži kosterního svalstva (Goto et al. 2000; Baar et al. 2002; Terada et al. 2002; Terada et Tabata 2003; Pilegaard et al. 2003) a při hladovění v srdci a játrech (Lehman et al. 2000; Rhee et al. 2003). V játrech je exprese PGC-1 α závislá na transkripčním faktoru CREB – spekuluje se o možnosti účasti tohoto faktoru při kontrole glukoneogeneze (Herzig et al. 2001). K expresi PGC-1 β dochází rovněž vlivem hladovění, ale ne při působení chladu (Lin et al. 2002; Lin et al. 2003).

Expres a aktivita PGC-1 α je indukována celou řadou signálně výše postavených složek mnohých kaskád. Transkripce genu *PGC1A* v játrech a hnědé tukové tkáni je řízena β -adrenergní/cAMP signalizační kaskádou (Puigserver et al. 1998). V tkáni příčně pruhovaného svalstva je to působení kalcineurinu A a CaMK (calcium/calmodulin-dependent protein kinase) (Czubryt et al. 2003; Handschin et al. 2003; Schaeffer et al. 2004), nebo AMPK (AMP-activated protein kinase) (Zong et al. 2002). p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) aktivuje a zvyšuje stabilitu tohoto koaktivátoru (Puigserver et al. 2001; Knutti et al. 2001; Fan et al. 2004). Rovněž se spekuluje o úloze NO ve zvyšování oxidační kapacity v mitochondriích (Finck et Kelly 2006). Inzulín působí pravděpodobně inhibičně na expresi genu *PGC1A*, která je potlačena činností PKB (protein kinase B)/Akt (Daitoku et al. 2003).

Kromě fosforylace působí na aktivitu PGC-1 α řada jiných posttranslačních úprav včetně acetylace a metylace a vliv inhibičních proteinů (Knutti et al. 2001; Rodgers et al. 2005; Teyssier et al. 2005).

Pokusy s knokautováním genu pro PGC-1 α u myši upevnily jeho předpokládanou pozici v kontrole mitochondriálního metabolismu srdeční svaloviny. Došlo k mírnému snížení schopnosti udržovat homeostázu ATP a fosfokreatinu a odpovědosti srdce na zátěž a stimulaci β -adrenergních receptorů (Leone et al. 2005; Arany et al. 2005). V kardiomyocytech transgenních myši, u kterých byla nadnormální expres PGC-1 α pod vlivem kontroly promotoru spouštějícího expresi genu pro těžký řetězec α -myosinu, došlo ke zřetelnému zvýšení biogeneze mitochondrií a k následné kardiomyopatii a smrti způsobené srdečním selháním (Lehman et al. 2000). Pokusy na myších vystavených vlivu dlouhodobé hypertenze prokázaly sníženou hladinu PGC-1 α spolu s expresí PPAR α cílových genů důležitých pro oxidaci mastných kyselin. Je tedy pravděpodobné, že PGC-1 α má roli v patogenezi srdečního selhání (Lehman et Kelly 2002; Finck et al. 2002).

V kosterním svalstvu se PGC-1 α zvýšeně exprimuje při krátkodobém i vytrvalostním cvičení u lidí (Pilegaard et al. 2003; Russell et al. 2003) i na myších modelech (Goto et al. 200; Baar et al. 2002; Terada et al. 2005; Taylor et al. 2005). U myši s transgenně zvýšenou expresí PGC-1 α se zvýšil podíl svalových vláken typu I (tzv. pomalých, oxidativních vláknem), zvýšením

množství myoglobinu a mitochondrií došlo k intenzivnějšímu červenému zbarvení svalové tkáně (Lin et al. 2002). Vyřazením PGC-1 α z funkce genu snížilo počet mitochondrií a respirační kapacitu pomalých svalových vláken. Ve svalových vláknech druhého typu zůstaly hodnoty beze změny (Leone et al. 2005).

Ve svalech se PGC-1 α rovněž podílí na transportu glukózy (exprese transportního proteinu GLUT4) (Michael et al. 2001) a na snižování její oxidace. Aktivuje expresi kinázy, která fosforyluje enzym pyruvát dehydrogenázu. Výsledkem je pokles řenosu pyruvátu do mitochondrií (Wende et al. 2005).

Během hladovění, kdy je produkce ATP závislá na oxidaci mastných kyselin, ketogenezi a glukoneogenezi, se exprese PGC-1 α a PGC-1 β koaktivátorů v játrech výrazně zvyšuje. Jejich genová exprese je jinak na nízké úrovni (Puigserver et al. 1998; Lin et al. 2003; Herzig et al. 2001; Yoon et al. 2001). PGC-1 α a PGC-1 β aktivují expresi cílových genů jaderného receptoru PPAR α , zapojených do oxidativní fosforylace. U experimentů snižujících aktivitu PGC-1 α došlo zároveň ke snížení exprese genů oxidace mastných kyselin (Koo et al. 2004; Leone et al. 2005) a genů glukoneogeneze (Koo et al. 2004). U PGC-1 α knock-outovaných myší byla při krátkodobém hladovění zjištěna hypoglykémie (Lin et al. 2004).

Příjem diety s vysokým podílem tuků vede ke spuštění funkce transkripčního faktoru SREBP (sterol responsive element binding protein) s PGC-1 β jako koaktivátorem. SREBP je faktor s kritickou úlohou v metabolismu lipidů, včetně lipogeneze a sekrece lipoproteinů. Zvýšená exprese PGC-1 β tak může vést ke zvýšené tvorbě a sekreci triglyceridů játry, hypertriglyceridémii a hypercholesterolémii (Lin et al. 2005).

V diabetických játrech je stejně, jako je tomu v případě hladovění, silně zvýšená aktivita PGC-1 α (Rhee et al. 2003; Puigserver et al. 2003; Herzig et al. 2001; Yoon et al. 2001). PGC-1 α může přispívat ke vzniku inzulínové rezistence zvyšováním produkce glukózy játry a inhibicí signalizace PKB/Akt kaskády (Koo et al. 2004). Zvýšená exprese PGC-1 α v β -buňkách pankreatu potlačuje glukózou stimulovanou produkci inzulínu (Yoon et al. 2003). Na rozdíl od spíše negativního vlivu, jaký má zvýšená exprese PGC-1 α na játra a pankreas, jsou jisté náznaky, že

u svalové tkáně se chová z hlediska inzulínové rezistence spíše protektivně, příkladem může být aktivace exprese transportního proteinu GLUT4 (Michael et al. 2001). Nadměrná exprese PGC-1 β v buňkách kosterního svalstva v pokusech prováděných na myších chránila před obezitou a inzulínovou rezistencí (Kamei et al. 2003). PGC-1 α by mohl fungovat jako potencionální kandidát prevence či léčby mitochondriálních dysfunkcí, které jsou možnou příčinou inzulínové rezistence a metabolických poruch (Wilson et al. 2004). Na druhou stranu však bylo zjištěno, že PGC-1 α deficientní linie myší jsou, navzdory snížené respirační kapacitě svalových mitochondrií (Leone et al. 2005), do jisté míry chráněny vůči inzulínové rezistenci indukované dietou s vysokým podílem tuků. Jedná se pravděpodobně o následek snížené produkce glukózy játry.

Nové poznatky týkající se regulačních molekul jako jsou PGC-1 koaktivátory umožňují lepší pochopení mnohých signalizačních drah, kterými organismus reaguje a adaptuje se na změny vnějších podmínek. Jako klíčové molekuly v energetickém metabolismu mnohých tkání a potencionální spojka s patogenezí onemocnění jako je srdeční selhání a diabetes představují členové rodiny PGC-1 koaktivátorů atraktivní cíl budoucích terapií.

B.1.2. Transkripční faktor NF- κ B

Inducibilní transkripční faktory napomáhají organismu zejména pomocí změn v genové expresi přizpůsobit se vlivům okolního prostředí. Tyto změny bývají zpravidla rychlé a mají dlouhodobý charakter. Jedním z klíčových faktorů umožňujících organismu přizpůsobit se dynamice vnějšího životního prostředí je transkripční faktor NF- κ B (nuclear factor-kappa B) (Hayden et Ghosh 2004). Poprvé byl tento transkripční faktor popsán v souvislosti s transkripcí genů kódujících κ lehký řetězec B-lymfocytů (Sen et Baltimore 1986).

z evolučního hlediska se jedná o velmi konzervativní protein nacházející se prakticky ve všech buněčných typech. Je nezbytný v mnoha biologických procesech, přičemž nejdůležitějšími jsou ty, týkající se imunitního systému. Po navázání ligandů k takovým receptorům, jako jsou například receptory T- a B-lymfocytů, receptory pro TNF- α (tumor necrosis factor- α), CD40,

rodina receptorů Toll/IL-1R (inter leukin-1R) a mnoha dalších, řídí expresi genů transkribujících cytokiny, růstové faktory a efektorové enzymy (Ghosh et al. 1998; Silverman and Maniatis 2001; Li et Verma 2002; Bonizzi et Karin 2004). Nepodílí se pouze na regulaci genů důležitých pro správnou funkci imunitního systému. NF- κ B má svou nepopiratelnou roli při diferenciaci a fyziologii tkání kostí, prsní žlázy, kůže a centrální nervové soustavy.

Zatím ještě nebyla zcela vyřešena otázka, zda jsou všechny tyto dosti různorodé funkce NF- κ B transkripčního faktoru řízeny jedním obecným mechanismem, či je k různorodosti transkripčních odpovědí šitých na míru jednotlivým orgánům zapotřebí různých signálních podnětů. Na specifitě působení se podílí i exprese široké palety různých regulačních molekul včetně povrchových receptorů a existence hierarchie mezi jednotlivými kinázami IKK (inhibitor of κ B kinase) a inhibičními proteiny I κ B (inhibitor of κ B) v různých buněčných typech (tyto proteiny a jejich obecné charakteristiky budou probrány později v textu). Tato různorodost spolu s variací v NF- κ B vazebných místech na DNA, které reagují pouze se specifickými homo- a heterodimery, umožňují buňkám odpovídat na změny působící na organismus pouze ve správnou dobu a spuštěním exprese pouze v dané chvíli potřebných genů.

B.1.2.1. Členové rodiny NF- κ B/Rel

NF- κ B není označení pro jediný protein, ale je to skupina homo- a heterodimerů složená ze členů rodiny NF- κ B/Rel: NF- κ B1 (p50 a jeho prekurzor p105), NF- κ B2 (p52 s prekurzorem p100), c-Rel, RelA (p65) a RelB – jako jediný z této skupiny není schopen tvořit homodimer (Siebenlist et al. 1994; Ghosh et al. 1998). Podjednotky NF- κ B1 a NF- κ B2 mohou ještě vznikat, kromě z výše zmíněných prekurzorů, kotranslačními mechanismy z vhodných mRNA (Baldwin 2001). Dále sem patří virový onkoprotein v-Rel, X-Rel u žáby rodu *Xenopus* a Dorsal, Dif and Relish faktory u mouchy rodu *Drosophila*.

Členové Rel rodiny sdílejí vysoce konzervativní doménu RHD (Rel homology domain) čítající 300 aminokyselin, nacházející se v blízkosti N-konce proteinu, umožňující dimerizaci, vazbu na DNA, jadernou translokaci a vazbu inhibičního proteinu I κ B, který zakrývá jaderný

lokalizační signál a většinou zadržuje NF- κ B v neaktivní formě v cytoplasmě (Siebenlist et al. 1994; Ghosh et al. 1998).

Nejčastější aktivní formou heterodimeru je p50/p65, případně p52/p65, ale existuje samozřejmě řada dalších homo- a heterodimerů řídících transkripci mnoha genů (Kopp et Ghosh 1995; Attar et al. 1997). Pouze RelA a cRel mají doménu jejíž navázání na DNA dává dostatečně silný podnět pro zahájení transkripce. Rel proteiny postrádající tuto doménu mohou působit jako silní inhibitoři transkripce (Senftleben et Karin 2002).

Studie prováděné na myších s knokautovannými geny pro jednotlivé členy rodiny NF- κ B odhalily jejich různé funkce. Myši s nefunkčním genem pro RelA umíraly již během embryonálního vývoje, který byl doprovázen silnou degenerací a apoptózou jater účinkem proapoptotického cytokinu TNF- α . Hepatotoxický účinek přerušení NF- κ B signalizační dráhy je vázán zejména na období embryonální vývoje. Inhibice této kaskády v játrech je u dospělých jedinců vcelku dobře tolerována, ale celkově snižuje imunitní obranu hostitele a zanechává jedince zranitelné vůči oportunním infekcím (Lavon et al. 2000).

V játrech, a např. ještě v synoviální tkáni, má tedy NF- κ B antiapoptotické účinky (Miagkov et al. 1998). V jiných typech tkání tomu ale může být naopak. Jeho aktivace má za následek, kromě indukce AP-1 (activator protein-1), rovněž produkci molekuly FasL - ligandu receptoru Apo/Fas se silně proapoptotickým účinkem (Kashibhatla et al. 1998). Akt (také nazývaný PKB, protein kinase-B) spolu s PDGF (platelet derived growth factor) mohou působit jako signál pro buněčné přežití inhibicí NF- κ B indukované aktivaci kaspázy-8 spouštějící apoptózu (Wang et al. 1998; Romashkova et Makarov 1999).

U myši postrádajících funkční gen pro p50 nebo RelB došlo k ovlivnění některých funkcí imunitního systému, jinak u nich vývoj probíhal normálně. B-lymfocyty u těchto myši vykazovaly abnormální reakci vůči mitogenům a produkci protilátek. RelB je navíc důležitý pro správný vývoj a diferenciaci dendritických buněk a mutace postihující gen pro RelB mají za následek poškození antigenní prezentace.

U myši se současně knockautovanými geny pro p50/p52 došlo k poškození B-lymfocytů a patologickým změnám v diferenciaci osteoklastů a k osteoporóze. Stejný efekt však nebyl pozorován pokud byl nefunkční pouze jeden gen ze zmíněné dvojice. (Franzoso et al. 1997; Iotsova et al. 1997).

Homodimery p50 jsou nezbytné pro IL-1 indukovanou expresi kolagenázy synoviálními buňkami (Miyazawa et al. 1998). Homodimer p65 aktivovaný trombinem reguluje expresi ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) buňkami endotelu (Rahman et al. 1999). Oba proteiny, p50 i p65, mají svou úlohu v konstitutivní produkci IL-6 synoviálními fibroblasty, což je pravděpodobnou příčinou rozvoje revmatoidní artritidy. Heterodimery těchto proteinů jsou intimně zapojené do aktivace prozánětlivých genů signálními molekulami IL-1 a TNF- α v lidských monocitech. Efekty těchto molekul jsou potlačeny působením protizánětlivého cytokinu IL-10 (Schottelius et al. 1999).

Dá se tedy říct, že všechny proteiny této rodiny jsou víceméně nepostradatelné pro správnou funkci imunitního systému.

B.1.2.2. Geny transaktivované NF- κ B

NF- κ B kóduje mnoho cílových genů: cytokiny TNF- α , TNF- β (lymfotoxin), IL-2 (a jeho receptor), IL-6, IL-8, podjednotku p40 IL-12, IF- γ (Interferone γ), IF- β (interferone β), G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), M-CFS (monocyte colony-stimulating factor), GM-CSF, MCP-1 (monocyte chemoattractant molecule-1), adhezivní molekuly VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1, ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1), E-selektin. Dále kóduje proteiny imunoreceptorů: κ lehký řetězec imunoglobulinů, TCR (T-cell receptor) α a β , MHC (major histocompatibility complex) třídy I a II, prekursor sérového amyloidu A, angiotensinogen, komplementový faktor B a C4, transkripční faktory cRel, p105, I κ B α , c-Myc, stresem aktivované geny iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (cyclooxygenase-2), PLA₂ (phospholipase A₂) a další. Rel proteiny jsou zapojené do vytváření lymfoidní tkáně, produkce

protilátek, izotypového přesmyku, diferenciaci, aktivace a proliferace B a T lymfocytů (Senftleben et Karin 2002).

NF- κ B sehrává kritickou roli v regulaci apoptotických procesů s dopadem na buněčnou proliferaci, diferenciaci a tumorogenezi. Mezi antiapoptotické proteiny, jejichž genová exprese je regulována NF- κ B, patří např. skupina proteinů IAPs (inhibitor of apoptosis proteins); antiapoptotičtí zástupci rodiny Bcl-2 proteinů, adaptorové molekuly TRAF (TNF- α receptor-associated factor) a další. Mezi transkripčním faktorem NF- κ B regulované proapoptotické molekuly patří CD95 (death receptor Fas) a TRAIL-R1 a -R2 (TRAIL-receptor) a jejich ligandy, např. FasL a TRAIL (TNF- α related apoptosis inducing ligand). Dalšími molekulami zapojenými do regulace apoptózy jsou transkripční faktory p53 a c-Myc a proapoptotický protein Bcl-xS (Kucharczak et al. 2003).

B.1.2.3. Aktivace NF- κ B signalizační kaskády

Důležitým krokem ve stimulaci signalizační kaskády NF- κ B je fosforylace kinázy IKK, která následně fosforyluje inhibiční protein I κ B. Uvolnění a degradace I κ B umožní dosud inhibovanému transkripčnímu faktoru přesun do jádra, navázání na specifická místa v blízkosti promotorů cílových genů a spuštění transkripce (Hayden et Ghosh 2004). Jednotlivé fáze tohoto komplexního procesu budou podrobněji probrány dále v textu.

K aktivaci signalizační kaskády transkripčního faktoru NF- κ B dochází v reakci buňky na infekční produkty bakterií a virů (lipopolysacharidy), prostaglandiny, radiaci, cytokiny (IL-1, IL-2, M-CSF, GM-CSF, TNF α , TNF β), mitogenně působící molekuly (lektiny PDGF, estery forbolu), ROS (reactive oxygen species), hyperglykémii, zvýšené hodnoty FFA (free fatty acid), AGE (advanced glycation end-products), signály aktivující T-lymfocyty, růstové faktory a další (Rothwarf et Karin 1999; Baeuerle et Baltimore 1988; Baeuerle et Henkel 1994; Siebenlist et al. 1994; Verma et al. 1995).

B.1.2.3.1. IKK kinázy

Fosforylace inhibičního proteinu I κ B kinázou IKK (I κ B kinase) je nezbytným krokem vedoucím k degradaci I κ B a aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B. K fosforylaci I κ B dochází na specifických serinových zbytcích na NH₂-konci proteinu. Následuje jeho polyubikvitinace a proteolytická degradace. Volný NF- κ B se pak v jádře váže ke κ B zesilovačům transkripce a spouští transkripci cílových genů.

IKK je velký proteinový komplex skládající se alespoň ze tří katalytických podjednotek IKK α a IKK β (také nazývaných IKK-1 a IKK-2) a regulačního dimeru IKK γ , také nazývaného NEMO (NF- κ B essential modulator) – toto seskupení představuje nejčastěji se vyskytující formu IKK. Proteinové podjednotky sdílejí zhruba 52% similaritu v aminokyselinovém složení a podobnou strukturní organizaci (Shimada et al. 1999).

Hlavní roli v degradaci I κ B a aktivaci NF- κ B hraje podjednotka IKK β . IKK α je zase nezbytná pro zkrácení prekurzorového p100 na jeho aktivní formu p52. IKK γ /NEMO, i když sám postrádá kinázovou aktivitu, je nezbytný ke stimulaci NF- κ B. K aktivaci IKK může dojít např. fosforylací kinázou NIK (NF- κ B inducing kinase). IKK může být stimulována prozánětlivými cytokiny TNF α a IL-1. Co se týká stimulace NF- κ B dráhy prozánětlivými signály, aktivující jednotkou je IKK β (Delhase et al. 1999). Po přijetí specifických signálů buňkou či působením určitých látek dochází k aktivaci IKK fosforylací specifických serinových zbytků na aktivační smyčce každé z podjednotek (Mercurio et al. 1997).

V hierarchii signalizační kaskády může být IKK aktivována nadřazenými kinázami, jako jsou např. NIK (NF- κ B inducing kinase) a MEKK1 (MAPK/ERK kinase kinase 1) a IKK-příbuzná kináza NAK (NF- κ B-activating kinase), někteří členové rodiny kináz PKC (protein kinase C) a řada dalších. (Lee et al. 1997; Tojima et al. 2000; Chio et al. 2004).

IKK je umístěna v klíčovém místě signálních drah mnoha typů tkání (Aupperle et al. 1999). V jaterní tkáni myši s knockoutovaným genem pro IKK β dochází k apoptóze. Tento efekt je ještě zesílený v přítomnosti prozánětlivého a proapoptotického cytokinu TNF- α (Li et al. 1999). U myši, u kterých byla knockoutovaná katalytická jednotka IKK α , byla zaznamenána abnormální

morfogeneze. Vyšlo totiž najevo, že se tento protein podílí na diferenciaci keratinocytů a morfogenezi epidermis (Hu et al. 1999). IKK β je exprimována v synoviálních buňkách a hraje centrální roli v aktivaci NF- κ B zprostředkované signálními molekulami IL-1 a TNF- α a v expresi prozánětlivých genů (Aupperle et al. 1999). Stejně tak tato podjednotka řídí aktivaci a transkripci prozánětlivých genů v lidských monocytech a CD4⁺ T-lymfocytech.

Existují ještě jiné kinázy než I κ B kinázy, účastníci se aktivace NF- κ B signalizační kaskády, u kterých je stejně jako u IKK jejich působení uskutečněno fosforylací. Patří sem např. NF- κ B kináza (Hayashi et al 1993), fosfoinositid 3-kináza (Béraud et al 1999), MEK (MAP kinase) kináza (Hirano et al 1996), protein kináza A (PKA) (Rabbi et al.1998) a další.

B.1.2.3.2. Inhibiční proteiny skupiny I κ B

Doposud byly popsány tři hlavní inhibiční I κ B u savců (α , β , ϵ). Jako proteiny zabraňující vstupu aktivovaného transkripčního faktoru do jádra rovněž slouží prekurzory některých Rel proteinů. Byl také identifikován I κ B proteinu podobný Bcl-3 rovněž s inhibiční funkcí (Siebenlist et al. 1994; Baldwin 1996). Samotný NF- κ B kóduje transkripci skupiny proteinů I κ B a tím zpětně reguluje svou vlastní funkci. I κ B vstupuje do jádra, kde odděluje NF- κ B od DNA a sám se na něj naváže díky vzájemné vysoké afinitě mezi a inhibičním proteinem a transkripčním faktorem. Návrat zpět do cytoplazmy je umožněn díky jaderné exportní sekvenci umístěné na I κ B (Arenzana-Seisdedos et al. 1997).

Inhibiční proteiny, které striktně zadržují inaktivní NF- κ B v cytoplasmě dokud buňka nepřijme patřičný signál jsou I κ B β a I κ B ϵ . V případě komplexu I κ B α -NF- κ B se ukázalo, že v nestimulovaných buňkách není jeho cytoplasmatické umístění statické a komplex se může přesouvat mezi jádrem a cytoplasmou bez ohledu na stimulaci. Umístění v daném okamžiku je tak výsledkem dynamického procesu, ve kterém dochází ke střídání vstupu do jádra na základě jaderného lokalizačního signálu NF- κ B a rychlému vypuzení zpět do cytoplazmy díky exportním jaderným signálům umístěným na inhibičním proteinu I κ B α (Arenzana-Seisdedos et al. 1997; Johnson et al. 1999; Huang et al. 2000; Malek et al. 2001). Vhodná buněčná stimulace pak posune

rovnováhu zrušením tažné síly exportního signálu I κ B ve prospěch jaderného lokalizačního signálu NF- κ B.

I κ B α se přednostně váže k Rel doméně p50/p65 heterodimeru a p50 homodimeru (u kterého nijak neomezuje vazbu na DNA) a je důležitý z hlediska dočasné aktivace NF- κ B, zatímco proteolýza I κ B β je asociována s dlouhodobější aktivitou transkripce (Li et Nabel 1997). Na prodloužené aktivaci NF- κ B po fosforylaci inhibiční jednotky I κ B β se částečně podílí zpoždění její resyntézy po degradaci (Thompson et al. 1995).

I κ B ϵ se v endotelových buňkách váže na p65, v menší míře pak na c-Rel. Je tak patrné, že se funkce jednotlivých inhibičních proteinů v různých tkáních navzájem překrývají, navíc v některých tkáních se vyskytují pouze určité formy I κ B, což dělá z tohoto proteinu velmi zajímavý cíl možností léčby některých onemocnění, které mají spojitost s NF- κ B signalizační kaskádou (viz. dále).

Degradace inhibičních proteinů I κ B závisí na jejich fosforylaci v N-regulační oblasti, následném navázání ubikvitinu a degradaci 26S proteasomem (Alkalay et al. 1995; DiDonato et al. 1995). Fosforylace a ubikvitinace mají některé společné rysy. Ke spuštění obou těchto procesů dochází velmi rychle po přijetí extracelulárního iniciačního signálu a zároveň může dojít k rychlé reverzi těchto procesů skupinou předem připravených fosfatáz a deubikvitináz. Jedná se o základní procesy přítomné u všech eukaryontních organizmů, určené k proteinové modifikaci (Ben-Neriah 2002).

Po navázání ubikvitinu nedojde pouze k proteosomální degradaci proteinů skupiny I κ B, ale rovněž se přeskupí a zkrátí prekurzory NF- κ B1/p105 a NF- κ B2/p100 a vzniknou aktivní formy p50 a p52 (i když se dříve myslelo, že v případě p105 dochází k jeho zkrácení výhradně současně s jeho translací) (Lin et al 1998). Podobně jako I κ B proteiny jsou NF- κ B prekurzory fosforylovány působením kinázy IKK. p105 působením IKK β (Ciechanover et al. 2001) a p100 zase působením IKK α (Senftleben et al. 2001). Mezi degradací I κ B a zkracováním transkripčních prekurzorů však existuje významný rozdíl, a tím je kinetika celé reakce. Zatímco proteolýza inhibičních proteinů je kompletní během několika minut po stimulaci buňky, změna prekurzorů na jejich aktivní formy je

otázkou několika hodin, a to i v případě stimulované buňky. Důvodem může být potřeba zapojit do fosforylace a ubikvitinace více účastníků, nebo průběh reakcí v takových kompartmentech buňky, ve kterých se liší přístup k enzymům a regulátorům. Zpomalení reakce může mít také svůj původ v molekulárních vlastnostech samotných prekurzorů (Ben-Neriah 2002).

B.1.2.4. Spojitost signalizační kaskády NF- κ B s některými typy onemocnění

Transkripční faktory rodiny NF- κ B řídí metabolické pochody, které jsou klíčové pro správné fungování celého organismu. Je proto pochopitelné, že jakákoliv chyba či odchylka v jejich fyziologické funkci, ať už se jedná o přerušení signalizační kaskády a neuskutečnění aktivace transkripce potřebných genů nebo naopak jejich aktivita v situacích, které si vyžadují nevšimavost ke spouštěcím signálům, může vést v konečném důsledku k více či méně závažným poruchám metabolismu.

B.1.2.4.1. Oxidační stres a NF- κ B

Signalizační kaskáda NF- κ B je aktivovaná celou škálou fyzikálních, chemických a biologických událostí, z nichž ty nejvýznamnější se týkají oxidačního stresu a působení volných kyslíkových radikálů (ROS) (Karin et Ben-Neriah 2000, Schreck et al. 1991). Pravděpodobnost stimulace NF- κ B v buňkách, které mají např. zvýšenou koncentraci H₂O₂ (peroxid vodíku) je velmi vysoká (Pande et Ramos 2003). Je možné, že ROS ovlivňují stimulaci NF- κ B na několika místech aktivační kaskády. Dochází k oxidaci klíčových míst kináz fosforylujících a aktivujících kinázy skupiny IKK, nebo jsou IKK ovlivněny přímo oxidačně-redukčními podmínkami v buňce. ROS ovlivňují i transport aktivovaného NF- κ B do jádra (Yamamoto et Gaynor 2001; Collins et Cybulsky 2001; Dalton et al 1999; Traenckner et al. 1995). TNF- α , který je známý svou rolí při aktivaci NF- κ B indukuje peroxidaci lipidů v buňkách vyvolávající vznik oxidačního stresu a stimulaci NF- κ B (Bowie et al. 1997). Existuje několik inhibitorů NF- κ B aktivovaného působením oxidačního stresu. Většinou se jedná o antioxidanty s funkcí scavengerů volných

radikalů – glutation (Ozaki et al. 2002; Cho et al. 1998), N-acetyl-cystein (NAC) (Raju et al. 1994), α -lipoová kyselina (Sen et al. 1998), PDTC (pyrrolidinedithiocarbamate) (Ferran et al. 1995; Schreck et al 1992) a řada dalších (Pande et Ramos 2005).

B.1.2.4.2. Zánětlivá onemocnění a NF- κ B

NF- κ B má nepopíratelnou roli v onemocněních, kde je hlavním patologickým faktorem chronická zánětlivá reakce jako jsou astma, revmatoidní artritida a idiopatické střevní záněty. U onemocnění jako jsou ateroskleróza, Alzheimerova nemoc a diabetes mellitus, ve kterých je zánět zapojen jako jeden ze spolupůsobících vlivů, byly zjištěny změny v regulaci NF- κ B (Yamamoto et Gaynor 2001).

Svou schopností transkribovat prozánětlivé geny hraje aktivace NF- κ B/Rel centrální úlohu v zánětlivých procesech. Je nepochybné, že se jedná o jeden z nejdůležitějších regulátorů v prozánětlivé genové expresi. K transkribovaným genům patří přinejmenším 27 různých cytokinů, chemokinů, antimikrobiálních peptidů a receptorů zapojených do antigenního rozpoznávání, jako jsou členové MHC, proteiny zapojené v prezentaci antigenu a receptory nezbytné pro migraci a adhezi neutrofilů (Pahl 1999), jako jsou např. E-selektin, VCAM-1 a ICAM-1. Naopak inhibice NF- κ B omezuje adhezi leukocytů a jejich diapedézu (Chen et al. 1995).

Mezi cytokiny a enzymy, jejichž syntéza je řízena NF- κ B patří například TNF- α , IL-1 β , IL-6 a IL-8, COX-2 či iNOS, jejichž činností vznikají NO a prostanoidy.

Díky studiím provedených na transgenních myších, jejichž T-lymfocyty postrádaly NF- κ B signální dráhu se zjistilo, že NF- κ B hraje důležitou roli v hypersenzitivních odpovědích pozdního typu (Aronica et al. 1999).

Zvířecí modely potvrdily významnou účast NF- κ B v patogenezi zánětlivé artritidy, konkrétně v aktivaci synoviální kolagenázy (Han et al. 1998). Pokusy se selektivní aktivací specifických členů NF- κ B rodiny pomocí aktivovaného IKK β vyvolaly v chrupavčité tkáni synoviální zánět s klinickými příznaky artritidy (Tsao et al. 1997). Naopak intra-artikulární

aplikace dominantně negativní formy adenovirového IKK β vedla k potlačení příznaků synovitidy (Tak et al. 1999).

Tkáňově specifická aktivace NF- κ B indukuje u zvířecích modelů tvorbu prozánětlivých cytokinů v ledvinné tkáni a následnou glomerulonefritidu (Sakurai et al. 1996). Zvýšená aktivita NF- κ B ve střevním epitelu a produkce IL-1, způsobená knockoutováním genu protizánětlivého IL-2 u myši, má za následek zánět tlustého střeva (Yang et al. 1999).

Pokud se u myši, u kterých bylo alergenem vyvoláno astma, zabrání aktivaci genu pro p50, dojde ke zmírnění negativního působení eosinofilních granulocytů a snížení produkce cytokinů IL-5 a chemotakticky působících cytokinů MIP-1 α (macrophage inflammatory protein) a MIP-1 β a následnému hromadění mononukleárů v místě infekce. Podobné výsledky byly zaznamenány i v případě inaktivace Rel-c – došlo ke snížení hypersenzitivity, infiltraci eosinofily a snížení sérových hladin imunoglobulinů třídy E u myši s alergenně-vyvolaným astmatem (Donovan et al. 1999).

V případě lidských typů onemocnění, na kterých se významně podílí patologická zánětlivá reakce, byla v mnoha případech prokázána zvýšená aktivace NF- κ B indukující transkripci genů proinflatorních cytokinů, chemokinů, adhezních molekul, matrixových metaloproteináz, cyklooxygenázy-2, inducibilní nitrid oxid syntázy a jiných.

Stejně jako u myších modelů artritidy byla i u člověka prokázána spojitost mezi zvýšenou produkcí prozánětlivých molekul synoviálními buňkami a mononukleáry a zvýšenou transkripční činností podjednotek p50 a p65 (Han et al. 1998). U pacientů s osteoartritidou i revmatoidní artritidou je zvýšená konstitutivní exprese IKK α a zejména IKK β v buňkách izolovaných ze synovie. Účinek těchto kináz může být podstatně zesílen působením cytokinů TNF- α a IL-1. Výsledkem aktivace a translokace NF- κ B do jádra je transkripce genů pro IL-6, IL-8, ICAM-1 a kolagenázu-1 (Aupperle et al. 1999).

Podobné schéma zřejmě platí i v případě exprese cytokinů a adhezivních molekul u zánětlivých onemocnění dýchacích cest, potvrzené biopsiemi bronchů u pacientů trpících astmatem, kde byl prokázán zvýšený přesun aktivovaného NF- κ B do jádra v epitelích dýchacích

cest (Hart et al. 1998). NF- κ B aktivuje transkripci chemokinu RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted), který je produkován makrofágy plicní tkáně. Ten pak působí chemotakticky na monocyty, T-lymfocyty a eosinofily, které se přesouvají do místa zánětu a účastní se tak zánětlivé reakce (Hiura et al. 1999). Nepopíratelný je podíl NF- κ B na produkci NO plicní tkáně - u pacientů s astmatem byla zaznamenána jeho zvýšená koncentrace ve vydechaném vzduchu (Kharitonov et al. 1994).

Na poškozujícím charakteru zánětu, který doprovází infekci bakterií *Helicobacter pylori*, se rovněž podílí epiteliální NF- κ B. Existuje přímá korelace mezi počtem buněk se zvýšenou NF- κ B transaktivací a intenzitou gastritidy. Podobně je tomu v případě idiopatických střevních zánětů, mezi které patří např. Crohnova nemoc či proktokolitida (colitis ulcerosa), kdy makrofágy v lamina propria vykazují aktivaci p50, c-Rel a zejména p65. Terapie zaměřená proti p65 snižuje produkci proinflamatorních proteinů (Neurath et al. 1998). Steroidní léčba pacientů s idiopatickým střevním zánětem vedla ke zlepšení klinických příznaků onemocnění pravděpodobně inhibicí NF- κ B. Jeho snížená aktivita byla potvrzena biopsií (Ardite et al. 1998).

Alespoň částečný vliv mají působky signální dráhy NF- κ B u některých onemocnění nervové soustavy a zánětlivých projevech asociovaných s aterosklerózou (Mattson et Camandola 2001; Collins et Cibulsky 2001). NF- κ B je v buňkách endotelu cév aktivován působením oxidovaného LDL-cholesterolu (Cominancini et al. 2000). Dochází ke spouštění procesu aterosklerózy, přichycení a diapedéze monocytů pod endotel do cévní stěny a k diferenciaci monocytů na makrofágy. Aktivované makrofágy dále produkují zánětlivé a růstové faktory, které indukují proliferaci hladkého svalstva cévní stěny a fibrotické tkáně. Účast NF- κ B na těchto pochodech byla potvrzena (Bellas et al. 1995; Brand et al. 1996).

Alzheimerova nemoc je charakteristická intracelulárními neuronovými změnami vznikajícími jako následek hyperfosforylace tau-proteinu. Tento protein je ve zdravých neuronech navázán na povrch mikrotubulů, kde se účastní řízení jejich činnosti. Hyperfosforylace vede k odtržení jeho mikrotubulární domény a agregaci v tzv. NFT (neurofibrillary tangles) (Drewes 2004). V těchto strukturách navíc dochází k tvorbě tzv. AGEs. Hyperfosforylace tau-proteinu

i hromadění β -amyloidu a AGEs vede k aktivaci NF- κ B signální dráhy. Je známo, že komponenty NFT vyvolávají tvorbu ROS, známých aktivátorů NF- κ B. Jedním z cytokinů, jejichž přítomnost byla potvrzena u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou je prozánětlivě působící IL-6 transkribovaný NF- κ B (Yan et al. 1995). Plaky vznikající hromaděním β -amyloidu jsou obklopeny reaktivními astrocyty produkujícími prozánětlivé cytokiny včetně IL-1 β a TNF- α a neurotoxicky působící volné radikály, jako je např. NO vznikající činností astrocytární iNOS (Akama et al. 1998; Akama et Van Eldik 2000). Důležitý je také fakt, že zvýšená aktivace NF- κ B byla pozorována především v počátečních stádiích vznikajících plaků, v pozdějších fázích došlo k výraznému zeslabení funkce transkripčního faktoru. Je tedy možné, že se NF- κ B podílí na iniciaci vzniku neuritických plaků a apoptóze neuronů během počátečních fází onemocnění (Yamamoto et Gaynor 2001).

Zvýšená produkce volných kyslíkových radikálů je považována ze jeden z hlavních faktorů podílejících se na patologických příznacích doprovázejících diabetes mellitus. Z periferní krve pacientů trpících diabetickou nefropatií je možné izolovat mononukleáry, které jsou při imunohistochemickém barvení silně pozitivní na aktivovaný NF- κ B. Zároveň se vykazují zvýšenou vazebnou aktivitou tohoto transkripčního faktoru. Podání antioxidantů, jakým je například α -lipoová kyselina, zřetelně snižuje aktivitu NF- κ B v mononukleárech (Hoffman et al. 1999). ROS mají u diabetických pacientů rovněž na svědomí poškození pankreatických β -buněk – jeden z klasických příznaků doprovázející inzulin-dependentní diabetes mellitus (IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus). Aplikace antioxidantů, jakým je N-acetyl-L-cystein, který je prekurzorem jednoho z nejdůležitějších likvidátorů ROS - glutationu, vede i v tomto případě k výraznému zlepšení.

B.1.2.4.3. Další typy onemocnění

Výzkum poslední let odhalil NF- κ B jako transkripční regulátor HIV (human immunodeficiency virus). Byla objevena dvě NF- κ B vazebná místa na LTR (long terminal repeat) viru HIV, zapojená ve virové transkripci a replikaci (Alcami et al. 1995).

HTLV-I (human T-cell leukemia virus type I) je lidský retrovirus asociovaný s ATL (adult T-cell leukemia) a neurologickými poruchami jako jsou myelopatie a spastické obrny (Yoshida 1995). Klíčovým proteinem HTLV-I je tzv. Tax-protein, který má stimulační efekt na určité Rel/NF- κ B heterodimery na cytoplasmatické i jaderné úrovni. Výsledkem je výrazně zvýšená buněčná činnost a proliferace, které umožní narušení kontrolních bodů buněčného cyklu a rozvoj malignit (Mosialos 1997).

Další viry využívající “služeb” NF- κ B, podle všeho kvůli inducibilitě tohoto transkripčního faktoru, jeho schopnosti regulovat buněčný cyklus, replikovat DNA a ovlivňovat průběh apoptózy, jsou některé herpes viry, jako např. původce infekční mononukleózy a několika typů lidských malignit EBV (Epstein-Barr virus) nebo HCMV (human cytomegalovirus). HBx protein skupiny virů HBV (hepatitis B virus) má vliv na řadu transkripčních faktorů, včetně NF- κ B. Inhibice NF- κ B znemožňuje viru HSV (herpes simplex virus) jeho replikaci (Patel et al. 1998).

Transkripční faktor NF- κ B se sice podílí na antiapoptotických pochodech, ale zároveň hraje velmi důležitou roli v indukcii apoptózy (Barkett et Gilmore 1999). Příkladem aktivace apoptotické buněčné smrti může být působení ROS během ischemie/reperfuze, které se dá zmírnit blokováním NF- κ B (Moerman et al. 1999). V nervovém systému působí v případě zranění NF- κ B ve prospěch buněčného přežití zvýšenou transkripcí antiapoptotických faktorů a antioxidantů.

Abnormality v regulaci kaskády NF- κ B doprovázejí nezanedbatelné množství malignit. (Rayet et Gélinas 1999). Většinou se jedná o poruchy regulačních a inhibičních proteinů signalizační kaskády NF- κ B. Výsledkem je pak nepřetržitá aktivace, která se vyskytuje v mnoha případech nádorového bujení (Emmerich et al. 1999). Blokováním apoptózy a řízením buněčné proliferace se NF- κ B podílí na tumorigenezi. NF- κ B je aktivován řadou onkoproteinů, včetně onkogenní formy *Ras*, nebo virálními onkoproteiny, a je pravděpodobné, že je potřebný k *Ras* vyvolané indukcii buněčné transformace. Blokování NF- κ B tlumí chronickou myeloidní leukémií způsobenou vznikem fúzního proteinem Bcr-Abl (Rayer et Gélinas 1999). U více než 90% pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií je prokazatelná trvalá aktivace NF- κ B (Kordes et al. 2000). Konstitutivní aktivace NF- κ B a zejména pak jeho antiapoptotického působení může do značné

míry snížit úspěšnost chemoterapie a léčby ozařováním (Wang et al. 1996), jeho inhibice zlepšuje výsledky (Wang et al. 1999). Další velmi důležitý faktor, který může mít vliv na snížení úspěšnosti chemoterapeutické léčby, je zvýšená exprese genů tzv. MDR (multi-drug resistance) proteinů, do jejichž transaktivace je NF- κ B pravděpodobně zapojen (Zhou et al. 1997).

B.1.2.4.4. Terapeutické využití inhibice složek signální cesty NF- κ B

Výše uvedené údaje identifikují jednotlivé signální složky podílející se na aktivaci a inaktivaci NF- κ B a samotný transkripční faktor jako velmi slibné potenciální cíle mnoha terapií. Doposud dosažené výsledky u zvířecích modelů zkoumajících exogenně způsobené změny signalizační kaskády NF- κ B jsou velice slibné. Stále však zůstávají jisté pochybnosti, zda je vhodné si za cíl terapie vybrat faktor, který je nezbytný pro řadu základních funkcí imunitního systému. Je logické, že k použití inhibitorů NF- κ B, by se mělo přikročit jen pokud je to opravdu nezbytné a za účelem krátkodobé léčby, aby se zabránilo nepříznivým vedlejším účinkům na imunitní systém. Klasickým příkladem jsou vedlejší účinky doprovázející dlouhodobou léčbu nesteroidními protizánětlivými přípravky (NSAIDs – nonsteroidal anti-inflammatory drugs), nebo glukokortikoidy, u kterých je znám jejich inhibiční účinek na NF- κ B.

NSAID mají antipyretické, analgetické a antitrombogenní účinky, což je v daných situacích žádoucí. Zároveň ale působí nefrotoxicky a ulcerogenně na sliznici trávicí soustavy. Glukokortikoidy, jako jsou např. dexametason či prednisol, patří v současné době do jedné z nejvýznamějších skupin léků, používaných k terapii celé řady závažných onemocnění. Kromě metabolických efektů jako je mobilizace aminokyselin a mastných kyselin a aktivace glukoneogeneze v játrech, mají glukokortikoidy silný protizánětlivý účinek, tlumí například tvorbu kyseliny arachidonové. Co se týká působení na NF- κ B signalizační kaskádu, glukokortikoidy zvyšují míru exprese inhibičního proteinu I κ B a retenci transkripčního faktoru v cytoplasmě (Auphan et al. 1995; Scheinmann et al. 1995). Tímto způsobem mohou glukokortikoidy kompenzovat rychlou degradaci inhibičního proteinu I κ B α v reakci na působení např. TNF- α , či

estery forbolu. Glukokortikoidy navíc soutěží s NF- κ B o limitované množství koaktivátorů CBP a SRC-1 (steroid receptor coactivator) (Sheppard et al. 1998).

Rozsah negativního působení glukokortikoidů je individuální, pro každého pacienta musí být vytvořena optimální terapie. Dlouhodobé užívání může vést k řadě negativních vedlejších účinků jako jsou redistribuce tukové tkáně, obezita (Zakrzewska et al. 1997; McMaster et Ray 2007), osteoporóza (Robson et al. 2002) a jiné.

Mnoho látek různého původu a účinku používaných při léčbě zánětlivých onemocnění má vliv na aktivitu NF- κ B. Je např. pravděpodobné, že efekty kortikosteroidů, používaných při léčbě určitých onemocnění jsou zprostředkovány právě díky inaktivaci NF- κ B (Yamamoto et Gaynor 2001).

Látky nesteroidního charakteru s obsahem kyseliny salicylové, jako např. aspirin, působí se stejným výsledným efektem. Ovlivňují translokaci transkripčně aktivního NF- κ B do jádra tím, že inhibují degradaci inhibičního proteinu I κ B působením na IKK, či na stupně ležící výše v signalizační kaskádě. Aspirin působí jako kompetitivní inhibitor IKK β tím, že snižuje jeho schopnost vázat ATP (Yin et al. 1998). Tohoto výsledku je však dosaženo pouze při vysokých koncentracích, působení není totiž lokálně specifické. Vysoké koncentrace aspirinu mají díky jeho antitrombotickému efektu (snižuje funkci COX-1 a produkci thromboxanu A₂ krevními destičkami) (Awtry et Loscalzo 2000) bohužel nepříznivé vedlejší účinky, jako jsou zvýšená incidence krvácení v gastrointestinálním traktu a riziko mozkového krvácení (Colwell 2006).

Řada studií potvrzuje, že transformované a proliferující buňky jsou více náchylné k inhibici proteasomů než zdravé buňky (Adams 2002; Orłowski et al. 1998; Drexler 1997; Delic et al. 1998; An et al. 1998). Inhibice proteasomového systému naruší rovnováhu řady regulačních proteinů, spustí zastavení buněčného cyklu ve fázích G₁-S a G₂-M a apoptotické pochody v buňce. Bortezomib, dříve známý jako PS-341 či MLN-341, je prvním inhibitorem proteasomové aktivity, který byl schválen FDA (Food and Drug Administration) pro klinickou léčbu pokročilého mnohočetného myelomu (MM; multiple myeloma) (Rajkumar et al. 2005) (pro rozsáhlejší přehled inhibitorů doporučuji článek Pande et Ramos 2005).

Jiný způsob jak ovlivnit patologické stavy způsobené konstitutivní aktivací NF- κ B je použití I κ B mutantů, které jsou odolné proteasomové degradaci (Wang et al. 1996). Následkem je zvýšení citlivost vůči TNF- α proapoptotickému účinku (Van Antwerp et al 1996) a zvýšená míra buněčné smrti, která je účelem chemoterapie a ozařování.

Pro vývoj specifických terapií bude potřeba nejprve ověřit, kteří členové NF- κ B/Rel rodiny a složky signalizační kaskády (inhibiční proteiny I κ B, IKK kinázy s různým stupněm tkáňové specifiky) se přesně podílejí jako klíčové faktory jednotlivých zánětlivých onemocnění, jako je IKK β v revmatoidní artritidě, p65 v idiopatických střevních zánětech a další. Samozřejmě je velmi důležité zahrnout do úvahy jaký účinek budou mít zásahy v rámci celého systému. Blokáda aktivace NF- κ B může mít sice benefiční účinek v jednom typu tkáně, potenciálně však může mít cytotoxický dopad na játra, ve kterých inaktivace NF- κ B spolu s přítomností TNF- α působí jako silný proapoptotický signál - zvýšená koncentrace TNF- α je klasickým doprovodným příznakem revmatoidní artritidy (Tak et Firestein 2001).

V případě vývoje prostředků, které budou schopny tkáňově specificky kontrolovat regulaci NF- κ B signalizační kaskády, budeme moci u celé řady onemocnění ovlivnit již jejich počáteční stádia závislá na buněčných faktorech jako je právě NF- κ B (Pande et Ramos 2005). Potlačení poškozující zánětlivé reakce a zároveň zachování fyziologické funkce buněk je základem a zároveň cílem efektivní terapie.

C. Cíle dizertační práce

Cílem dizertační práce bylo rozšířit znalosti týkající se vlivu vysokoenergetických látek na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B a na transkripční faktor PPAR- γ a jeho koaktivátor PGC-1, které jsou členy významných zánětových a metabolických signalizačních kaskád. Vysokoenergetické látky v našem případě představují glukóza a mastné kyseliny, konkrétně kyselina olejová, jejichž nefyziologické koncentrace mají prokazatelně patologický vliv na organismus. U transkripčního faktoru NF- κ B byl do studie zapojen rovněž vliv glykosilovaného albuminu, zástupce tzv. Amadoriho produktů, které jsou dávány do spojitosti se závažnými civilizačními onemocněními.

Studie vlivu glukózy, kyseliny olejové a glykosilovaného albuminu na výše uvedené proteiny byla provedena na lidských hepatomových buňkách HepG2 bez interferujícího vlivu hormonálního působení.

Konkrétní cíle studie zahrnují:

1. Pomocí Western blottingu a imunoanalýzy stanovit vliv glykosilovaného albuminu na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B na základě jejich buněčné lokalizace cytosol/jádro;
2. Pomocí Western blottingu a imunoanalýzy stanovit vliv nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B na základě jejich buněčné lokalizace cytosol/jádro;
3. Pomocí RT-PCR stanovit vliv nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na transkripční faktory PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátory PGC-1 α a PGC-1 β ;
4. Pomocí inhibitoru translace cykloheximidu prozkoumat, zda je vliv nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na

transkripční faktory PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátorů PGC-1 α a PGC-1 β regulován *de novo* proteinovou syntézou;

5. Pomocí inhibitoru transkripce aktinomycinu D prozkoumat vliv nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na stabilitu mRNA transkripčních faktorů PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátorů PGC-1 α a PGC-1 β .

D. Materiály a metodika

D.1. Použité buněčné linie

Pro studii byla použita buněčná linie HepG2 (lidský hepatocelulární karcinom, human hepatoma cell line), běžně používaná v naší laboratoři a pravidelně kontrolovaná na přítomnost kontaminujících bakterií rodu *Mycoplasma* za použití RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) podle Harasawy et al. (2005), která umožňuje detekci několika hlavních druhů tohoto rodu současně. Buňky byly kultivovány podle doporučení ATCC v médiích EMEM (Minimum Essential Medium Eagle), popřípadě DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) obohacených o 10 % FBS (Fetal Bovine Serum), 1 mM sodium pyruvát, 2 mM L-glutamin a 50 IU/ml penicilin/streptomycin v humidním prostředí s 5% CO₂ atmosférou při teplotě 37°C. Všechny pokusy byly provedeny po dosažení přibližně 80% konfluence.

D.2. Buněčná frakcionace

Současná laboratorní technika a metodiky umožňují separovat a zkoumat jednotlivé buněčné organely a molekuly. Buňka musí být nejprve šetrným způsobem rozbita, aby se zachovaly její organely v relativně neporušeném stavu. Jemné mechanické techniky zahrnují postupy jako jsou homogenizace, rozbití buněk pomocí ultrazvuku, protlačení malým prostorem, rozbití pomocí pístu v dobře těsnící tlustostěnné nádobě, popřípadě perforaci plasmatické membrány použitím mírného detergentu. Následná centrifugace, která představuje nejběžnější postup separace buněčného homogenátu, pak oddělí buněčné složky na základě jejich hustoty a velikosti.

Proteiny klíčové pro naši práci vyžadovaly separaci cytosolové a jaderné frakce. Příprava cytosolových a jaderných extraktů vycházející z metody frakcionace podle Dignama (Mercier et al., 1999) byla dále upravena. Buněčná peleta s pufrem pro separaci cytosolové frakce byla protažena injekční stříkačkou, centrifugována při 12 000g a supernatant byl oddělen jako cytosolová frakce. Po promytí byla peleta homogenizována v pufru pro jadernou izolaci

a následnou centrifugací při 30 000g byla získána jaderná frakce. Ke každé frakci byl přidán Laemmliho pufr obsahující β -merkaptoetanol a po 5 minutách v 95°C se 20 μ g celkových proteinů nanášelo na 12% polyakrylamidové gely.

Ve vzorcích byla změřena koncentrace proteinů metodou Bradfordové, založené na vazbě barviva Coomassie blue na aminokyseliny. Připravené vzorky byly dále rozděleny SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) a přeneseny na nitrocelulóзовou membránu metodou Western-blotting. Detekce proteinů na membránách probíhaly prostřednictvím chemiluminiscence.

D.3. Immunoblotting

Základním principem imunochemických metod je reakce specifické protilátky se specifickým antigenem za vzniku komplexu, který je pak následně za použití různých technik možno detekovat. Blotovací metody kombinují výsledek gelové elektroforézy a specifitu detekce pomocí protilátky. SDS-PAGE dělí jednotlivé proteiny podle tvaru, velikosti a náboje. Pak jsou přeneseny (blotovány) na pevný nosič, nejčastěji nitrocelulóзовou (NC) membránu (nebo jiné membrány, jako například PVDF – polyvinylidene fluoride). Navázané proteiny jsou v denaturovaném stavu a jejich vazebná místa jsou zcela přístupná pro specifické protilátky. Vytvoří se komplex protein/primární protilátka/sekundární protilátka nesoucí enzym (nejčastěji HRP – Horseradish Peroxidase) rozkládající vhodný substrát za vzniku kvantifikovatelné chemiluminiscenční reakce.

Pro elektroforetickou separaci proteinů cytosolové a jaderné frakce (nanášeno 20 μ g na jamku) pomocí SDS-PAGE byly připraveny 10% nebo gradientové gely (gradient 7,5 – 15%). Následoval Western-blotting na NC membránu (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a detekce za použití králíčích (rabbit) monoklonálních protilátek anti-NF- κ B a anti-I κ B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) a sekundární HRP-konjugované kozí (goat) protilátky anti-rabbit IgG (Upstate, Dundee, UK; Cell Signaling Technology, Danvers, USA). Vzniklé proužky na membránách byly vizualizovány pomocí chemiluminiscenčního Western-blotting detekčního

systemu (Sigma, St. Luis, MO, USA) a vyhodnoceny automatizovanou denzitometrií využívající softwaru ChemiGenius System (Syngene, Cambridge, UK).

D.4. Kvantitativní RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction)

RT-PCR, také nazývaná jako kvantitativní RT-PCR (QRT-PCR), je laboratorní technika používaná současně k amplifikaci a kvantifikaci cílové sekvence izolované DNA molekuly. Zjišťuje se tak přítomnost či absence určité sekvence DNA molekuly ve vzorku a v případě její přítomnosti se stanoví počet jejích kopií. Metoda sleduje obecný princip polymerázové řetězové reakce s kvantifikací po každém cyklu amplifikace, tzv. „real time“ aspekt. RT-PCR je často kombinovaná s reverzní transkripcí dané mRNA. Výsledek umožní určit frekvenci genové exprese v určité buňce či tkáni.

V naší studii byla pomocí RT-PCR kvantifikována exprese mRNA genů sledovaných proteinů systémem Rapid Thermal Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Za použití High Pure RNA Isolation Kit byla z 10^6 buněk izolována celková RNA a následně reverzně transkribována do cDNA podle protokolu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Pro návržení primerů byla použita NCBI (National Center for Biotechnology Information) nukleotidová databáze a LightCycler Probe Design Software. Primery byly vhodně navrženy tak, aby přesahovaly exony kvůli zabránění vytváření cDNA z genomické DNA. Syntézu primerů provedla firma Metabion International (Martinsried, Germany). Primery jednotlivých stanovovaných složek včetně referenčních, tzv. housekeeping genů jsou uvedeny v tabulce 1.

Do skleněné kapiláry LightCycler jsme vložili 20 μ l reakční směsi skládající se z FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche), forward a reverse primerů (0.5 μ l každého) a 2 μ l reverzně transkribovaného vzorku. Pro vyloučení amplifikace genomické DNA nebo vnější kontaminace reagensů, byla paralelně s každou skupinou primerů provedena negativní kontrola bez reverzních transkriptů nebo bez cDNA templátu. Pro vyrovnání variability vstupního množství RNA, byly hodnoty mRNA každého vzorku normalizovány podle vnitřních referenčních genů – HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenace), Cynu (Cyclophilin A) a β -aktinu. Kvalita PCR produktů byla dále potvrzena analýzou křivky tání a v iniciálních fázích experimentů pomocí elektroforézy produktů amplifikace v agarovém gelu s následnou denzitometrií (ChemiGenius System, Syngene).

D.5. Statistické hodnocení

Na proteinové úrovni byly získané výsledky statisticky hodnoceny pomocí jedno- a dvou- výběrového Studentova *t*-testu a pomocí programu SPSS verze 14. Kvantitativní real time PCR stanovení byla normalizována faktorem odvozeným z exprese „housekeepingových“ genů a statisticky vyhodnocena pomocí *t*-testu a testu ANOVA a post-hoc analýzy na 5% hladině významnosti.

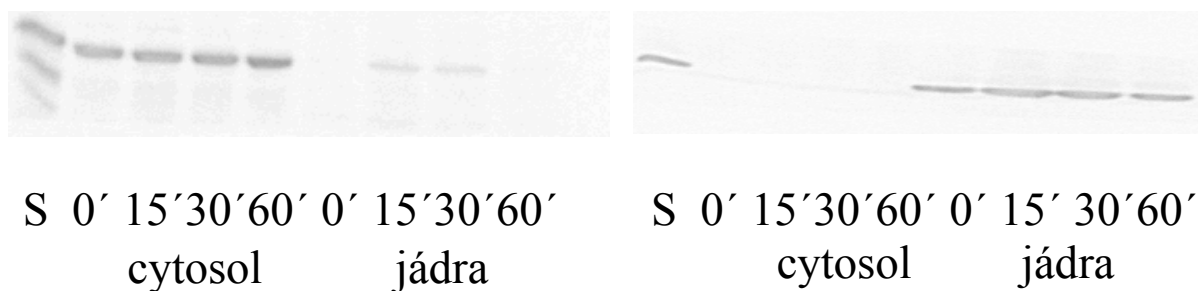
Zkratka	Forvard primer	Reverse primer	Typ	Citace
PPAR γ 1	AAAGAAGCCGACA CTAAACC	CTTCCATTACGGAGA GATCC	TARGET	Giusti et al. 2003
PPAR γ 2	GCGATTCCTTCACT GATAC	CTTCCATTACGGAGA GATCC	TARGET	Giusti et al. 2003
PGC1 α	TGTGCAACTCTCT GGAAGT	TGAGGACTTGCTGAG TGGTG	TARGET	Staiger et al. 2005
PGC1 β	GCTCTCCTCCTTCT TCCTCA	ATAGAGCGTCTCCAC CATCC	TARGET	Staiger et al. 2005
CynA	GCATACGGGTCCT GGCATCTTGTC	ATGGTGATCTTCTTG CTGGTCTTGC	REF	Kemp et al. 2003
GAPDH	ACCACAGTCCATG CCATCAC	TCCACCACCATGTTG CTGTA	REF	Blanquart et al. 2004
HPRT	GGACTGAACGTCT TGC	CTTCGTGGGGTCCTT T	REF	--

Tab. 1: Seznam stanovovaných složek a housekeepingových genů použitých pro normalizaci hodnot mRNA vzorků

E. Výsledky

E.1. Zavedení metody frakcionace na cytosol/jádra

Transkripční faktor NF- κ B se po působení vhodného stimulu odpojí od svého inhibičního proteinu I κ B a přesouvá se do jádra, kde spouští transkripci příslušných genů. Jedním z mnoha stimulů aktivujících tento transkripční faktor je oxidační stres. Pro ověření funkčnosti nově zaváděné metody buněčné frakcionace na cytosol a jádra byly buňky vystaveny působení 150 μ M H₂O₂ po dobu 15, 30 a 60 minut a porovnány vůči neovlivněné kontrole (0 minut). Detekce jaderného histonu H4, vysoce konzervativního proteinu, tvořícího část nukleosomu, potvrzuje oddělení cytosolové a jaderné frakce. **Obr. 1** v levé části znázorňuje přesun aktivovaného transkripčního faktoru NF- κ B do jádra, kde spouští transkripci oxidačním stresem indukovaných genů, v pravé části je zobrazena detekce histonu H4.

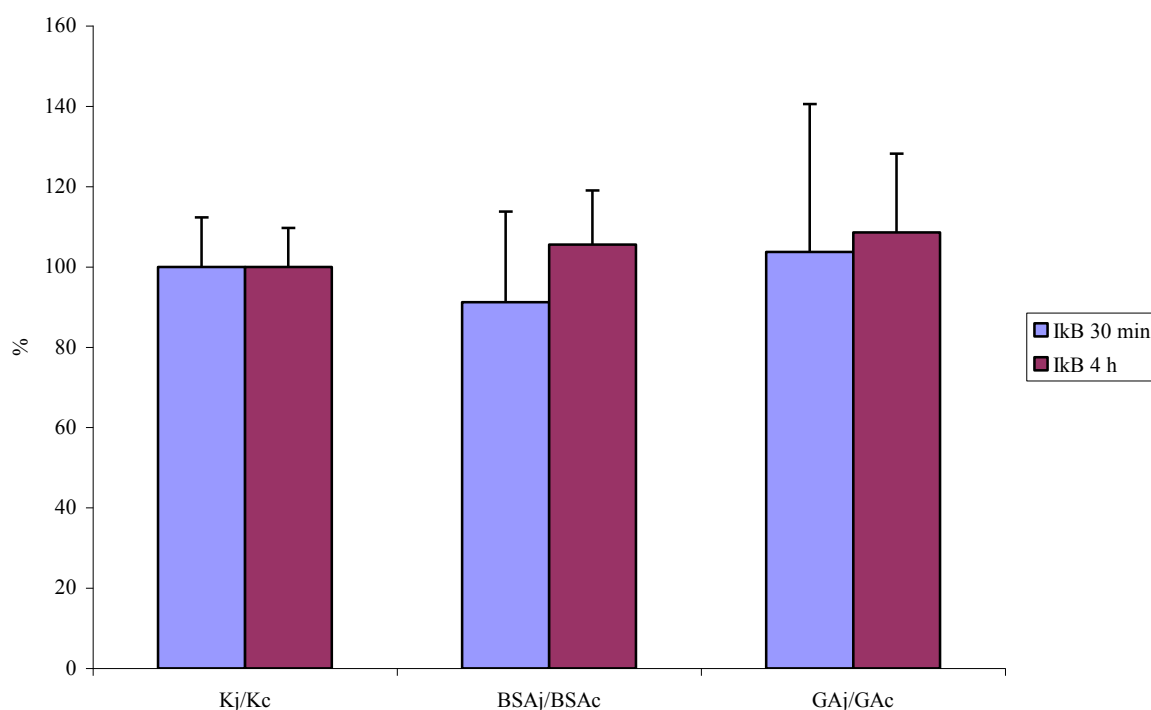


Obr. 1:

Levá část znázorňuje přesun aktivovaného transkripčního faktoru NF- κ B do jádra vlivem působení 150 μ M H₂O₂. Pravá část detekci histonu H4. S –marker molekulové hmotnosti.

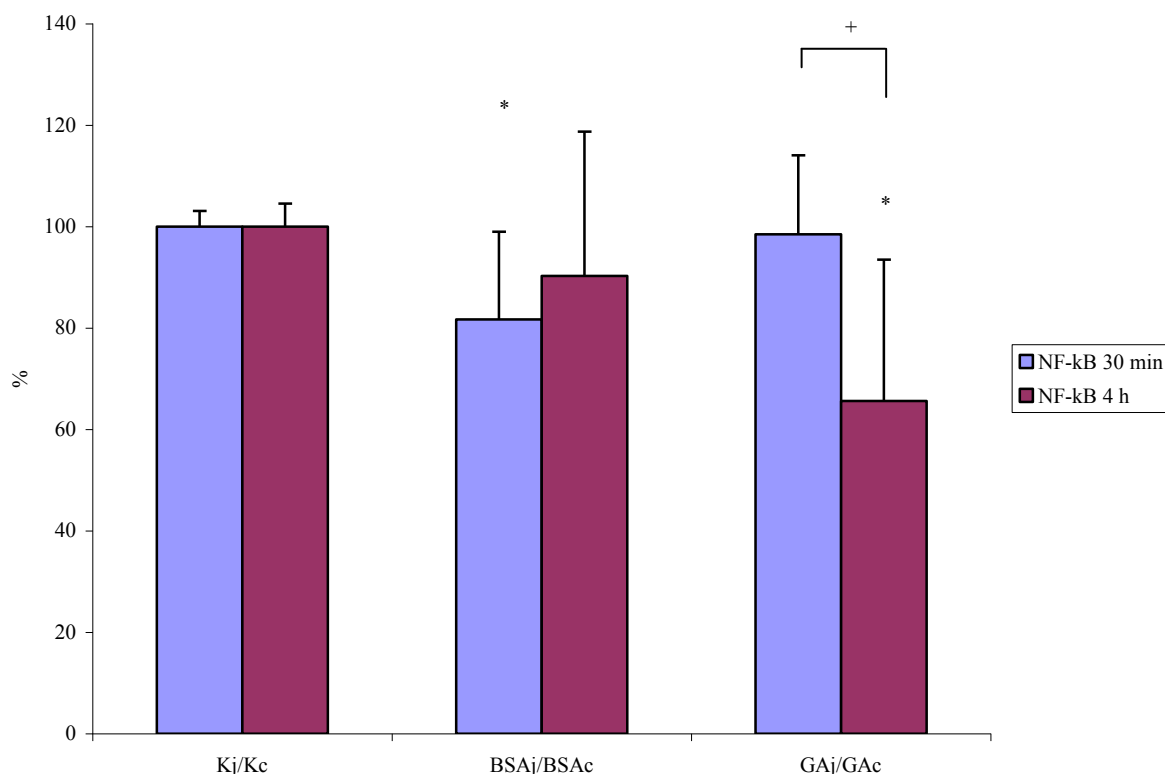
E.2. Stanovení vlivu glykosilovaného albuminu na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B na základě jejich buněčné lokalizace cytosol/jádro

Po dosažení 80% konfluence HepG2 v kultivačním mediu obsahujícím 10% FBS byly buňky vystaveny působení 500 μ g/ml glykosilovaného albuminu v kultivačním mediu s 1% FBS po dobu 30 minut a 4 hodin. Kontrolu představují vzorky ovlivněné BSA (bovinní sérový albumin) o koncentraci 500 μ g/ml v 1% FBS mediu a buňky kultivované pouze v mediu s 1% FBS 30 minut a 4 hodiny. Grafy 1 a 2 znázorňují změny v distribuci proteinů I κ B a NF- κ B v cytosolové a jaderné frakci. Změna je vyjádřena pomocí podílů naměřených hodnot jaderné/cytosolové frakce – j/c.



Graf 1: Změny v distribuci inhibičního proteinu I κ B v buněčných kompartmentech po 30 minutovém a 4 hodinovém ovlivnění glykosilovaným albuminem. Buňky byly vystaveny působení glykosilovaného albuminu 500 μ g/ml a bovinního sérového albuminu 500 μ g/ml; hodnoty naměřené ve vzorcích bez obou těchto látek slouží jako kontrolní hodnoty (100%). j – jaderná frakce, c – cytosolová frakce, K – kontrola, BSA – bovinní sérový albumin, GA – glykosilovaný albumin; chybové úsečky představují směrodatnou odchylku, * představuje signifikantní změnu vůči kontrole za použití jednovýběrového *t*-testu ($p < 0,05$); + představuje signifikantní změnu mezi hodnotami naměřenými ve vzorcích po 30 minutovém a 4 hodinovém ovlivnění za použití dvouvýběrového *t* - testu ($p < 0,05$).

Pro statistickou analýzu změn v proteinové distribuci u vzorků ovlivněných boviním sérovým albuminem (BSA) a glykosilovaným albuminem (GA) vůči kontrole (K) a vzorků ovlivněných glykosilovaným albuminem (GA) vůči vzorkům ovlivněných BSA byl jako test zvolen jednovýběrový Studentův *t*-test. Pro hodnocení změn v závislosti na délce ovlivnění (30 minut vs. 4 hodiny) pak dvouvýběrový Studentův *t*-test.



Graf 2: Změny v distribuci transkripčního faktoru NF-κB v buněčných kompartmentech po 30 minutovém a 4 hodinovém ovlivnění glykosilovaným albuminem. Buňky byly vystaveny působení glykosilovaného albuminu 500 μg/ml a boviního sérového albuminu 500 μg/ml; hodnoty naměřené ve vzorcích bez obou těchto látek slouží jako kontrolní hodnoty (100%). J – jaderná frakce, c – cytosolová frakce, K – kontrola, BSA – boviní sérový albumin, GA – glykosilovaný albumin; chybové úsečky představují směrodatnou odchylku, * představuje signifikantní změnu vůči kontrole za použití jednovýběrového *t*-testu ($p < 0,05$); + představuje signifikantní změnu mezi hodnotami naměřenými ve vzorcích po 30 minutovém a 4 hodinovém ovlivnění za použití dvouvýběrového *t*-testu ($p < 0,05$).

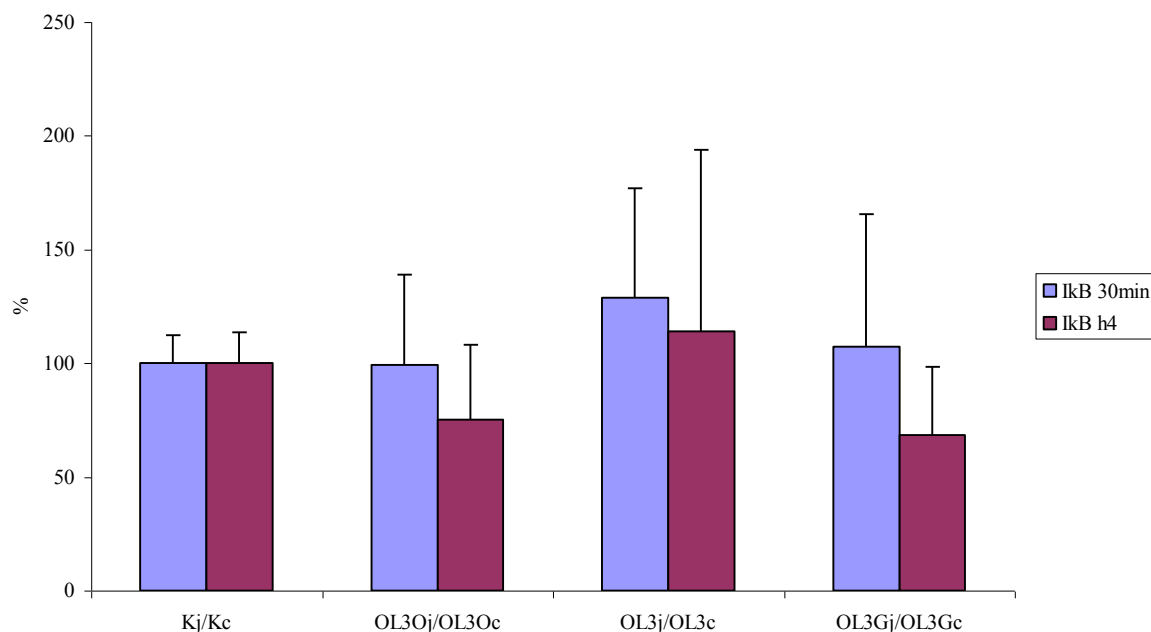
V případě inhibičního proteinu IκB nebyla pozorována žádná signifikantní změna distribuce ve sledovaných buněčných kompartmentech (viz. Graf 1). V případě transkripčního faktoru NF-κB (Graf 2) došlo ke snížení naměřených hodnot tohoto proteinu v jádře u buněk

ovlivněných BSA v časovém intervalu 30 minut vůči kontrole o 18,3 % ($p < 0,05$). Dále byla zaznamenána změna po čtyřhodinovém ovlivnění glykosilovaným albuminem, a to snížení výskytu transkripčního faktoru v jádře o 34,4% vůči kontrole ($p < 0,05$) a 32,9% ($p < 0,05$) vůči hodnotě stanovené po 30 minutovém působení glykosilovaného albuminu.

E.3. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B na základě jejich buněčné lokalizace cytosol/jádro

V kultivačním médiu obsahujícím 10% FBS byly HepG2 buňky po dosažení 80% konfluence vystaveny působení kyseliny olejové o 300 μ M koncentraci (OL3) v přítomnosti nulové – (OL3O), fyziologické – 5,5 mM (OL3) a vysoké – 30 mM (OL3G) hladiny glukózy v kultivačním médiu obsahujícím 1% FBS. Zvolené časové intervaly byly 30 minut a 4 hodiny.

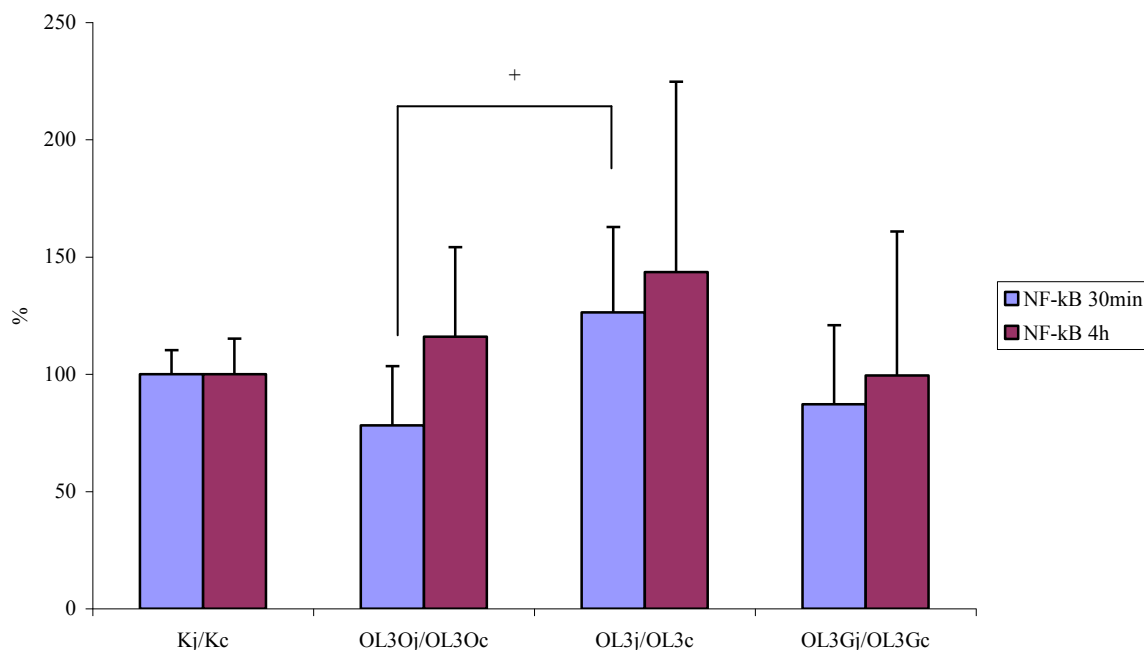
Zvýšená koncentrace glukózy a mastných kyselin se u diabetických pacientů podílí na oxidačním stresu a vzniku ROS (volné kyslíkové radikály). To vyvolává aktivaci signální kaskády NF- κ B. Ve vzorcích HepG2 ovlivněných současně kyselinou olejovou a různou koncentrací glukózy byla sledována těmito nutriety indukovaná změna aktivity transkripčního faktoru NF- κ B a jeho inhibičního proteinu I κ B.



Graf 3: Vliv různé koncentrace glukózy (0; 5,5; 30 mM) v kombinaci s přítomností kyseliny olejové (300 μ M) na změny v distribuci inhibičního proteinu I κ B v buněčných kompartmentech po 30 minutách a 4 hodinách ovlivnění. K – kontrola, c – cytosolová frakce, j – jaderná frakce, OL3 – kyselina olejová 300 μ M, OL3O – kyselina olejová v přítomnosti nulové glukózy, OL3 – kyselina olejová v přítomnosti fyziologické glukózy, OL3G – kyselina olejová v přítomnosti vysoké glukózy. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku, * představuje signifikantní změnu vůči kontrole za použití jednovýběrového *t*-testu ($p < 0,05$); + představuje signifikantní změnu mezi hodnotami naměřenými ve vzorcích po 30 minutách a 4 hodinách ovlivnění za použití dvouvýběrového *t*-testu ($p < 0,05$).

Změny v lokalizaci sledovaných proteinů v buněčných kompartmentech byly vyjádřeny pomocí poměru zjištěných hodnot v jaderné a cytosolové frakci – j/c, stejně jak tomu bylo v případě sledování vlivu glykosilovaného albuminu.

Pro statistické zhodnocení změn v jaderné/cytosolové lokalizaci byl použit jednovýběrový a dvouvýběrový Studentův *t*-test na 5% hladině signifikace. Graf 3 znázorňuje změny v připravených j/c frakcích u inhibičního proteinu I κ B, Graf 4 (viz. níže) pak změny u transkripčního faktoru NF- κ B.



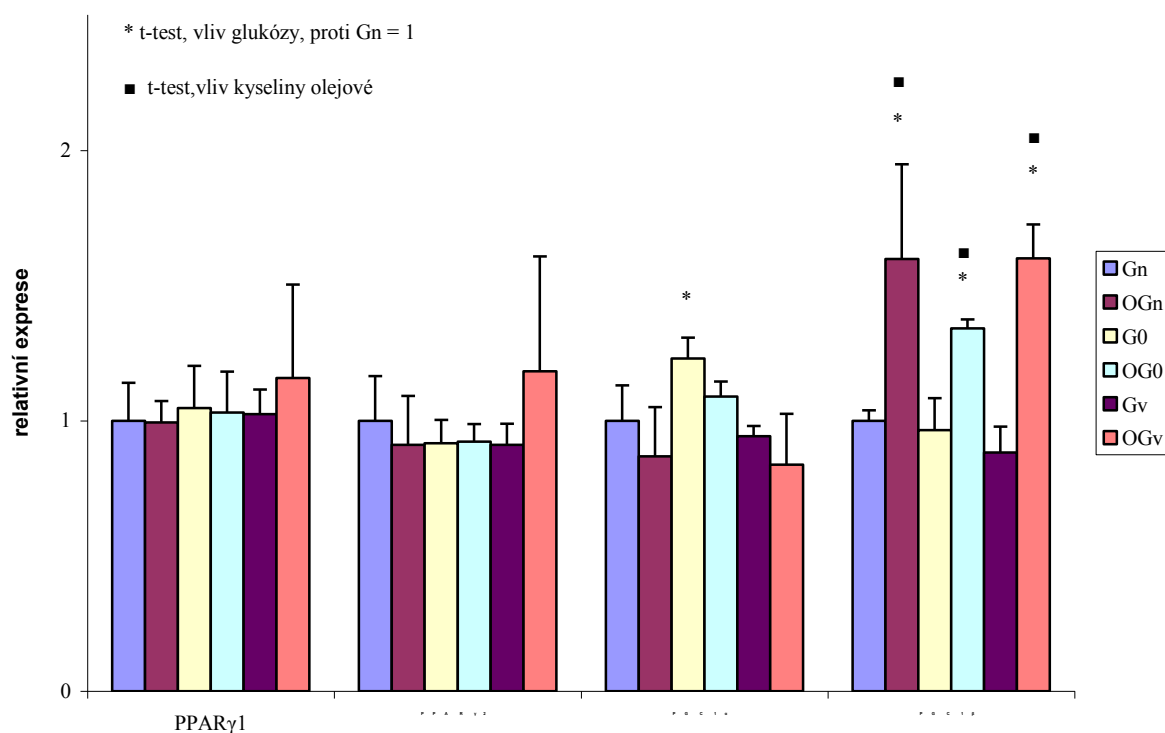
Graf 4: Vliv různé koncentrace glukózy (0; 5,5; 30 mM) v kombinaci s přítomností kyseliny olejové (300 μ M) na změny v distribuci transkripčního faktoru NF- κ B v buněčných kompartmentech po 30 minutách a 4 hodinách ovlivnění. K – kontrola, c – cytosolová frakce, j – jaderná frakce, OL3 – kyselina olejová 300 μ M, OL3O – kyselina olejová v přítomnosti nulové glukózy, OL3 – kyselina olejová v přítomnosti fyziologické glukózy, OL3G – kyselina olejová v přítomnosti vysoké glukózy. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku, * představuje signifikantní změnu vůči kontrole za použití jednovýběrového *t*-testu ($p < 0,05$); + představuje signifikantní změnu mezi hodnotami naměřenými ve vzorcích po 30 minutách a 4 hodinách ovlivnění za použití dvouvýběrového *t*-testu ($p < 0,05$).

Pomocí provedených statistických hodnocení nebyla zjištěna žádná významná změna u inhibičního proteinu I κ B signalizující jeho jadernou translokaci a inhibici transkripčních vlastností NF- κ B. V případě transkripčního faktoru NF- κ B byl zaznamenán signifikantní rozdíl 48%; ($p < 0,05$) mezi vzorky vystavenými působení nulové a fyziologické koncentrace glukózy v přítomnosti kyseliny olejové po dobu 30 minut.

E.4. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na transkripční faktory PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátory PGC-1 α a PGC-1 β

Na buňkách HepG2, které dosáhly 80% konfluence, byl pomocí RT-PCR na úrovni mRNA sledován vliv různé koncentrace glukózy (0, 5,5 a 30 mM) v kombinaci s přítomností/absencí 300 μ M kyseliny olejové na PPAR- γ 1, - γ 2, a jejich koaktivátory PGC-1 α a -1 β . Jako kontrolní byly použity hodnoty naměřené v buňkách ovlivněných normální glukózou (5,5 mM) s absencí kyseliny olejové (Gn).

Graf 5 znázorňuje změny v expresi mRNA pro PPAR- γ 1, - γ 2, a jejich koaktivátory PGC-1 α a -1 β , detekované v buňkách 30 minut od počátku experimentu. V Grafu 6 změny zaznamenané po 4 hodinách. Na konci 30 minutové periody došlo k signifikantnímu zvýšení exprese genu pro PGC-1 α v podmínkách nulové glukózy spolu s absencí kyseliny olejové (G0) - 123% kontrolní hodnoty; ($p < 0,05$). U buněk inkubovaných za podmínek nulové glukózy v přítomnosti kyseliny olejové bylo naměřeno téměř signifikantní snížení exprese v porovnání s buňkami G0; ($p < 0,062$).

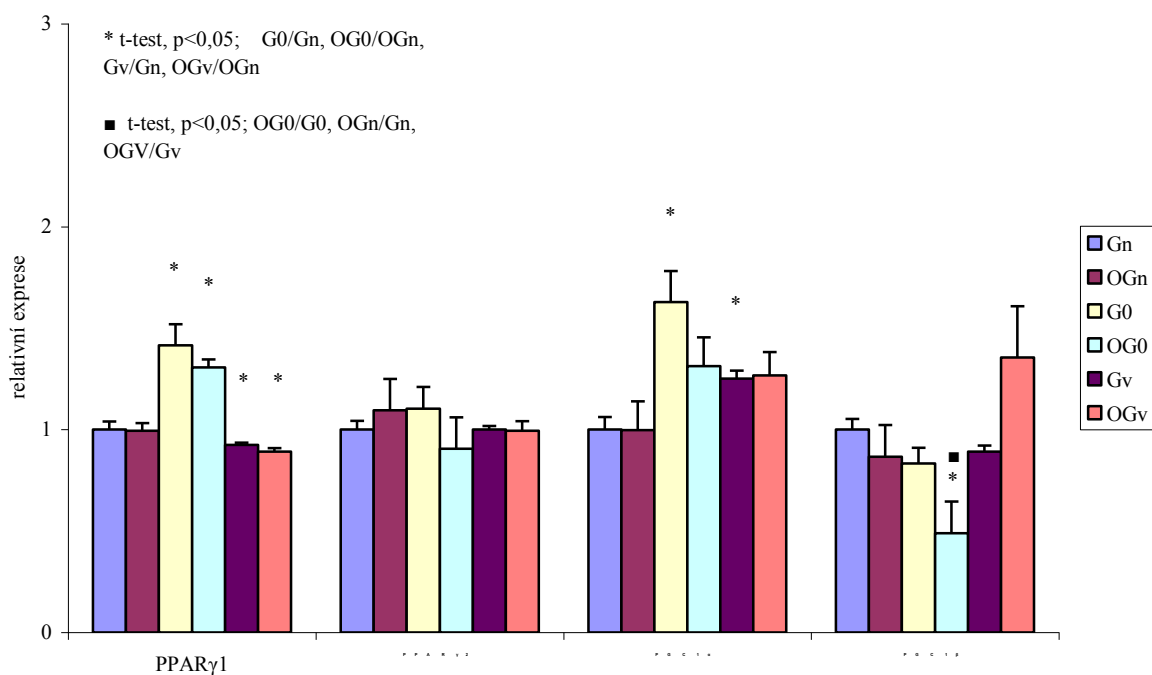


Graf 5: Vliv různé koncentrace glukózy (0; 5,5; 30 mM) v kombinaci s přítomností/absencí kyseliny olejové na relativní expresi sledovaných genů v HepG2 buňkách po 30 minutové inkubaci. Gn - normální glukóza, OGn – normální glukóza a 300 μ M kyselina olejová, G0 – nulová glukóza, OG0 nulová glukóza a 300 μ M kyselina olejová, Gv – vysoká glukóza, OGv - vysoká glukóza a 300 μ M kyselina olejová. * označuje signifikantní změnu mezi vzorky při použití *t*-testu ($p < 0,05$) proti normální glukóze (Gn); ■ označuje signifikantní změnu mezi vzorky při použití *t*-testu ($p < 0,05$) pro zjištění vlivu kyseliny olejové na změnu exprese, OG0/G0, OGn/Gn, OGV/Gv.

Dále v přítomnosti 300 μM kyseliny olejové došlo k signifikantnímu zvýšení mRNA hladin PGC-1 β v průběhu kratší inkubační doby (30 minut), a to 134% kontrolní hodnoty (Gn) u buněk inkubovaných v nulové glukóze (OG0), 160% kontrolní hodnoty u buněk inkubovaných v mediu s normální koncentrací glukózy (OGn) a 160% u buněk inkubovaných v podmínkách simulujících hyperglykémii (OGv), ($p < 0,05$) (viz. Graf 5).

Inkubace buněk v mediu s kyselinou olejovou měla za následek signifikantní zvýšení hladin mRNA koaktivátoru PGC-1 β u všech sledovaných hodnot glukózy – OGN vůči Gn vzrůst o 60%; OG0 vůči G0 vzrůst o 37%; OGv vůči Gv vzrůst o 72%; ($p < 0,05$). V průběhu 30 minutové inkubace nebyly zaznamenány žádné změny v hladinách mRNA u PPAR- γ 1 a - γ 2.

U dat získaných zpracováním buněk vystavených 4 hodiny působení definovaných podmínek byl pomocí *t*-testu definován vliv různé koncentrace glukózy a přítomnosti/absence oleátu (viz. Graf 6).



Graf 6: Vliv různé koncentrace glukózy (0; 5,5; 30 mM) v kombinaci s přítomností/absencí kyseliny olejové (300 μM) na relativní expresi sledovaných genů v HepG2 buňkách po 4 hodinové inkubaci. Gn - normální glukóza, OGN – normální glukóza a 300 μM kyselina olejová, G0 – nulová glukóza, OG0 nulová glukóza a 300 μM kyselina olejová, Gv – vysoká glukóza, OGv - vysoká glukóza a 300 μM kyselina olejová. * označuje signifikantní změnu mezi vzorky při použití *t*-testu ($p < 0,05$) pro zjištění vlivu glukózy na změnu exprese; G0/Gn, OG0/OGN, Gv/Gn, OGv/OGN; ■ označuje signifikantní změnu mezi vzorky při použití *t*-testu ($p < 0,05$) pro zjištění vlivu kyseliny olejové na změnu exprese, OG0/G0, OGN/Gn, OGV/Gv.

Při sledování vlivu glukózy byly v případě PPAR- γ 1 naměřeny signifikantní změny u všech sledovaných vzorků, G0 vůči Gn vzrůst 42%; OG0 vůči OGn vzrůst 32%; Gv vůči Gn pokles o 8%; OGv vůči OGn pokles o 10%; ($p < 0,05$).

U PPAR- γ 2 nebyly, stejně jako u 30 minutové inkubační periody, naměřeny žádné signifikantní změny v hladinách exprese v souvislosti s testovanými podmínkami.

V případě koaktivátoru PGC-1 α byly změny způsobené různou koncentrací glukózy definovány jako signifikantní v případě Gn/G0 – vzrůst exprese o 63% a Gn/Gv – vzrůst o 25%; ($p < 0,05$). U druhého sledovaného koaktivátoru PGC-1 β byl naměřen signifikantní pokles v expresi v případě, že sledovanou veličinou byla koncentrace glukózy v médiu a to u vzorků kultivovaných v přítomnosti kyseliny olejové za absence glukózy – OGn/OG0, pokles exprese o 38%; ($p < 0,05$).

Signifikantní změny vyvolané působením přítomnosti či absence oleátu byly naměřeny pouze u PGC-1 β , a to pokles exprese G0/OG0 o 34%; ($p < 0,05$).

E.5. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na syntézu proteinů *de novo*

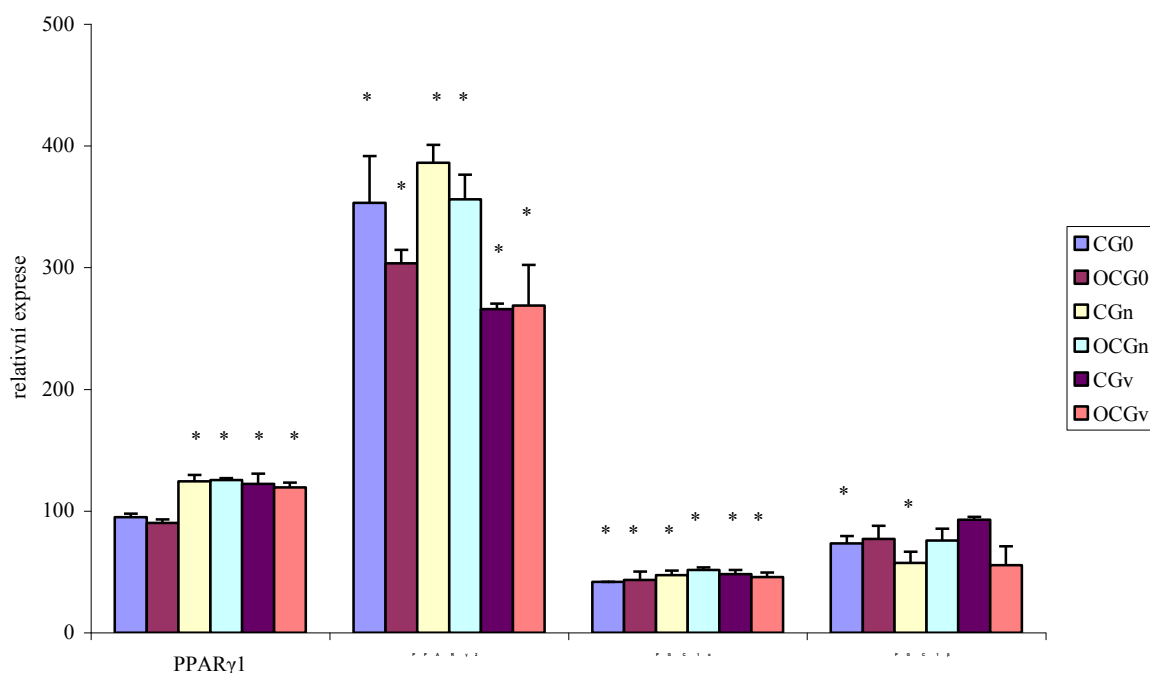
Abychom zjistili zda je vliv použitých nutrientů na transkripční faktory PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátory PGC-1 α a PGC-1 β regulován *de novo* proteinovou syntézou, byly buňky inkubovány v definovaném uspořádání (různá koncentrace glukózy, +/- oleát) v přítomnosti/absenci inhibitoru translace cykloheximidu (C) (1,4 μ g/ml) po dobu 4 hodin. Pro statistické hodnocení experimentu byl použit *t*-test, jako kontrolní hodnoty (100%) byly použity hodnoty naměřené ve vzorcích bez cykloheximidu (Graf 7; viz. níže).

U všech vzorků, s výjimkou vzorků inkubovaných v přítomnosti nulové glukózy (CG0) a nulové glukózy s kyselinou olejovou (OCG0), byla v přítomnosti cykloheximidu naměřena signifikantní indukce hladin mRNA PPAR- γ 1 vůči kontrole. V případě normální glukózy bez oleátu (CGn) zvýšení na 124% kontrolní hodnoty, u normální glukózy v přítomnosti oleátu (OCGn)

na 125%, a u vysoké glukózy za absence (CGv) nebo přítomnosti oleátu (OCGv) nárůst na 122% a 119% kontrolní hodnoty; ($p < 0,05$).

V případě transkripčního faktoru PPAR- γ 2 došlo k signifikantnímu zvýšení vůči kontrole u všech sledovaných skupin: CG0 na 353%; OCG0 na 303%; CGn na 386%; OCGn na 356%; CGv na 266% a OCGv na 269% kontrolní hodnoty; ($p < 0,05$).

U koaktivátoru PGC-1 α bylo naopak u všech sledovaných skupin zaznamenáno signifikantní snížení exprese: CG0 na 42%; OCG0 na 43%; CGn na 47%; OCGn na 51%; CGv na 48% a OCGv na 46%; ($p < 0,05$). V případě druhého sledovaného koaktivátoru PGC-1 β došlo k signifikantnímu snížení exprese pouze u vzorků inkubovaných v podmínkách nulové glukózy bez oleátu, snížení na 73% kontrolní hodnoty. U buněk v médiu s nulovou glukózou bez oleátu snížení na 57% kontrolní hodnoty; ($p < 0,05$).



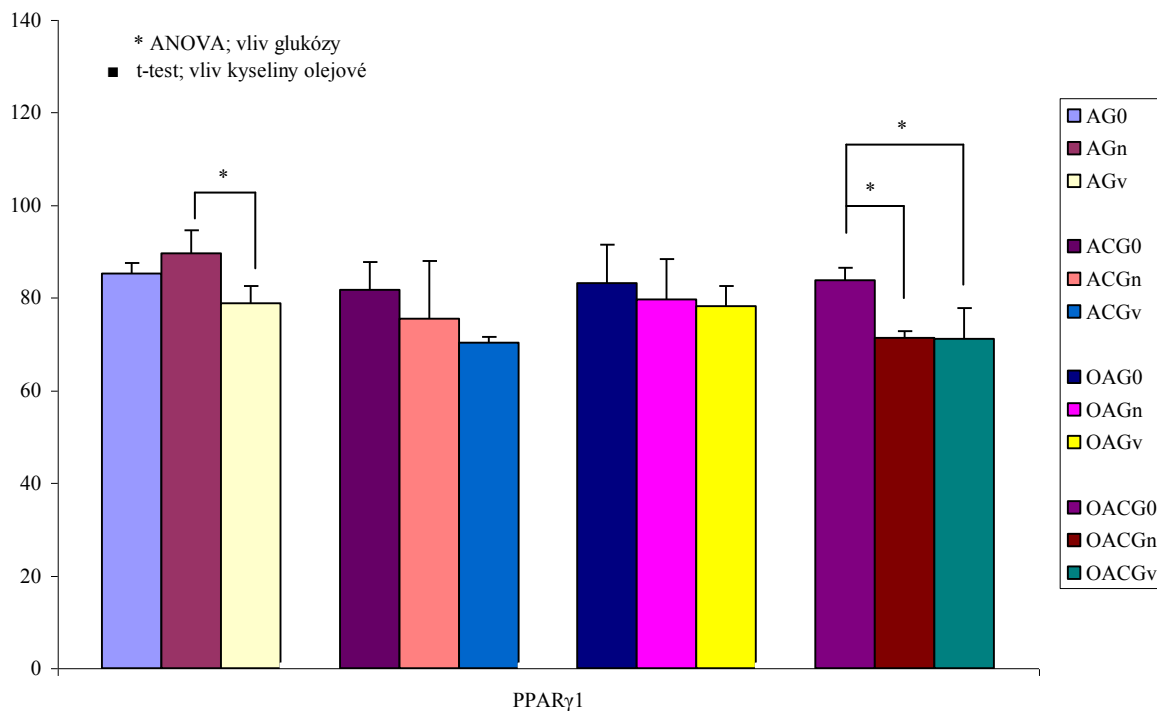
Graf 7: Vliv různé koncentrace glukózy (0; 5,5; 30 mM) v kombinaci s přítomností/absencí kyseliny olejové (300 μ M) na relativní expresi sledovaných genů v HepG2 buňkách v přítomnosti inhibitoru translace cykloheximidu po 4 hodinové inkubaci. Gn - normální glukóza, OGN – normální glukóza a 300 μ M kyselina olejová, G0 – nulová glukóza, OG0 nulová glukóza a 300 μ M kyselina olejová, Gv – vysoká glukóza, OGv - vysoká glukóza a 300 μ M kyselina olejová, cykloheximid (C) 1,4 μ g/ml. Hodnoty mRNA naměřené ve vzorcích bez cykloheximidu slouží jako kontrolní hodnoty (100%). * označuje signifikantní rozdíl mezi vzorky ovlivněnými cykloheximidem proti kontrolním hodnotám za použití t -testu ($p < 0,05$).

E.6. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na stabilitu mRNA transkripčních faktorů PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátorů PGC-1 α a PGC-1 β

Jako prostředek pro získání informací týkajících se vlivu testovaných látek na posttranskripční stabilitu byl použit inhibitor transkripce aktinomycin D (4 μ g/ml). Na základě předběžných výsledků, byla zvolena časová perioda působení 1 hodina před ukončením inkubace buněk s glukózou/kyselinou olejovou (celková doba inkubace byla 4 hodiny). Hodnoty naměřené po 3 hodinové inkubaci (tedy ještě před přidáním aktinomycinu D) pak sloužily jako kontrolní hodnoty (100%). Současně byl sledován kombinovaný vliv obou inhibitorů, aktinomycinu D (A) a cykloheximidu (C) přidaných k buňkám hodinu před ukončením inkubace jako třetí experimentální uspořádání (kontrola; aktinomycin D; aktinomycin D + cykloheximid).

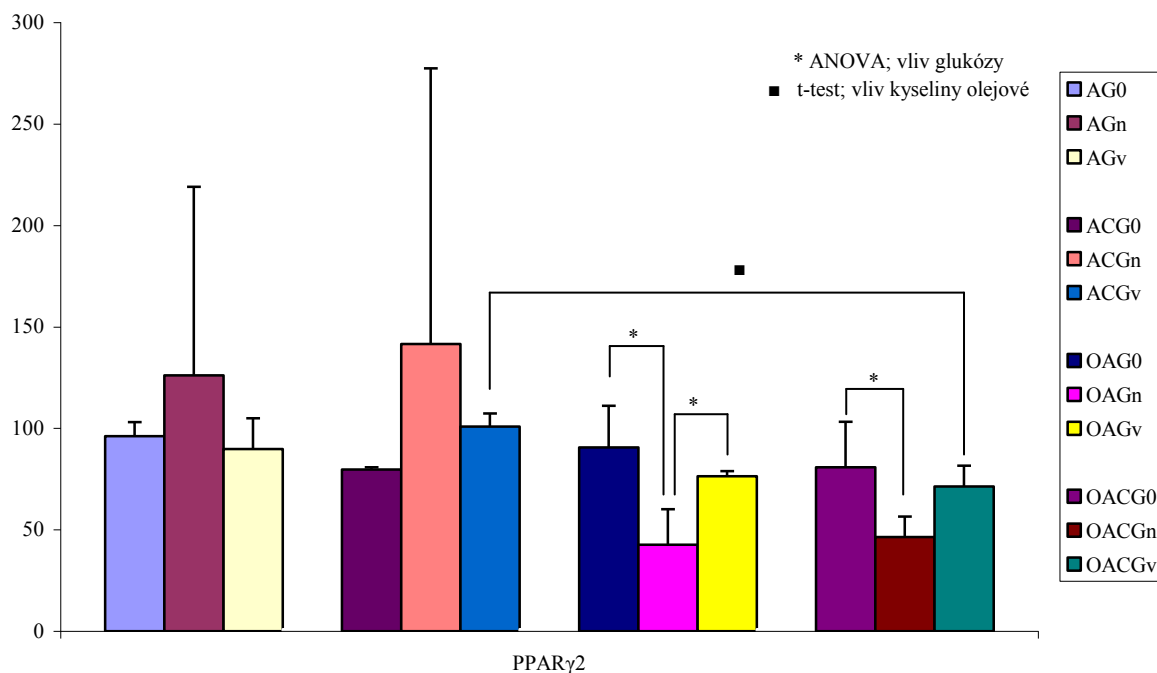
Pomocí testu ANOVA byl u sledovaných genů hodnocen vliv glukózy na posttranskripční stabilitu a pomocí *t*-testu vliv kyseliny olejové na stabilitu mRNA.

V hladinách mRNA PPAR- γ 1 (Graf 8; viz. níže) byly naměřeny signifikantní změny v případě buněk inkubovaných v přítomnosti oleátu, aktinomycinu a cykloheximidu. Jako nejstabilnější se v tomto případě jevila mRNA buněk inkubovaných v podmínkách nulové glukózy (OACG0), která dosáhla 84% kontrolní hodnoty. V prostředí normální glukózy (OACGn) a vysoké glukózy (OACGv) došlo shodně ke snížení hladiny mRNA na 71%; ($p < 0,05$). Signifikantní hodnoty 11% dosáhl rovněž rozdíl mezi buňkami inkubovanými v prostředí normální (AGn) a vysoké glukózy (AGv) v nepřítomnosti cykloheximidu a oleátu; ($p < 0,05$).



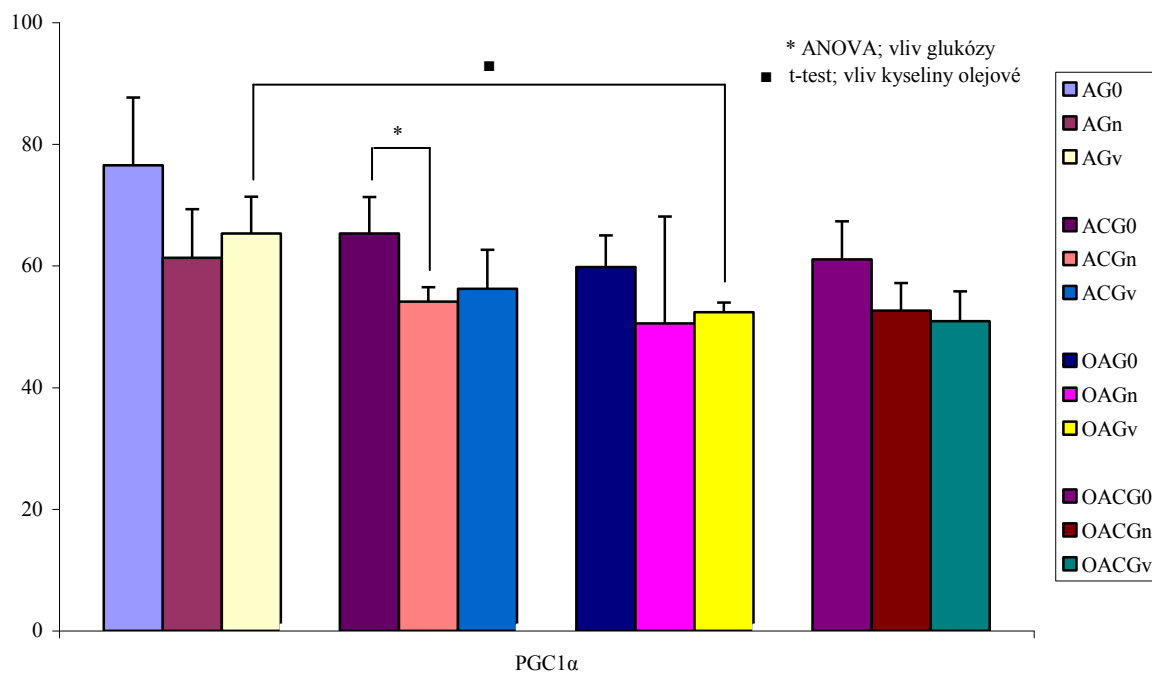
Graf 8: Vliv různé koncentrace glukózy (0; 5,5; 30 mM) v kombinaci s přítomností/absencí kyseliny olejové (300 μ M) na stabilitu mRNA PPAR γ 1 v HepG2 buňkách. Buňky byly inkubovány 4 hodiny v přítomnosti různé koncentrace glukózy a s/bez kyseliny olejové. K buňkám byl přidán 1 hodinu před ukončením experimentu inhibitor transkripce aktinomycin D (A) 4 μ g/ml, případně aktinomycin společně s inhibitorem translace cykloheximidem 1,4 μ g/ml (AC). Data získaná ze vzorků po 3 hodinách inkubace (bez aktinomycinu D) byla použita jako kontrolní hodnoty (100%). Gn - normální glukóza, OGn – normální glukóza a 300 μ M kyselina olejová, G0 – nulová glukóza, OG0 nulová glukóza a 300 μ M kyselina olejová, Gv – vysoká glukóza, OGv - vysoká glukóza a 300 μ M kyselina olejová, A – aktinomycin D, AC – aktinomycin spolu s cykloheximidem. * označuje signifikantní rozdíl mezi vzorky při použití testu ANOVA pro posouzení vlivu různé koncentrace glukózy ($p < 0,05$); ■ označuje signifikantní rozdíl mezi vzorky při použití *t*-testu pro posouzení vlivu přítomnosti/absence kyseliny olejové ($p < 0,05$).

V případě PPAR- γ 2 (Graf 9; viz. níže) byl naměřen signifikantní rozdíl 38% a 33% v hladinách mRNA u buněk inkubovaných v médiu bez cykloheximidu s normální koncentrací glukózy a s kyselinou olejovou (OAGn) vůči buňkám v médiu s nulovou (OAG0) a vysokou glukózou (OAGv); ($p < 0,05$). V přítomnosti cykloheximidu, oleátu a aktinomycinu byl signifikantní rozdíl 35% pouze mezi nulovou (OACG0) a normální glukózou (OACGn); ($p < 0,05$).



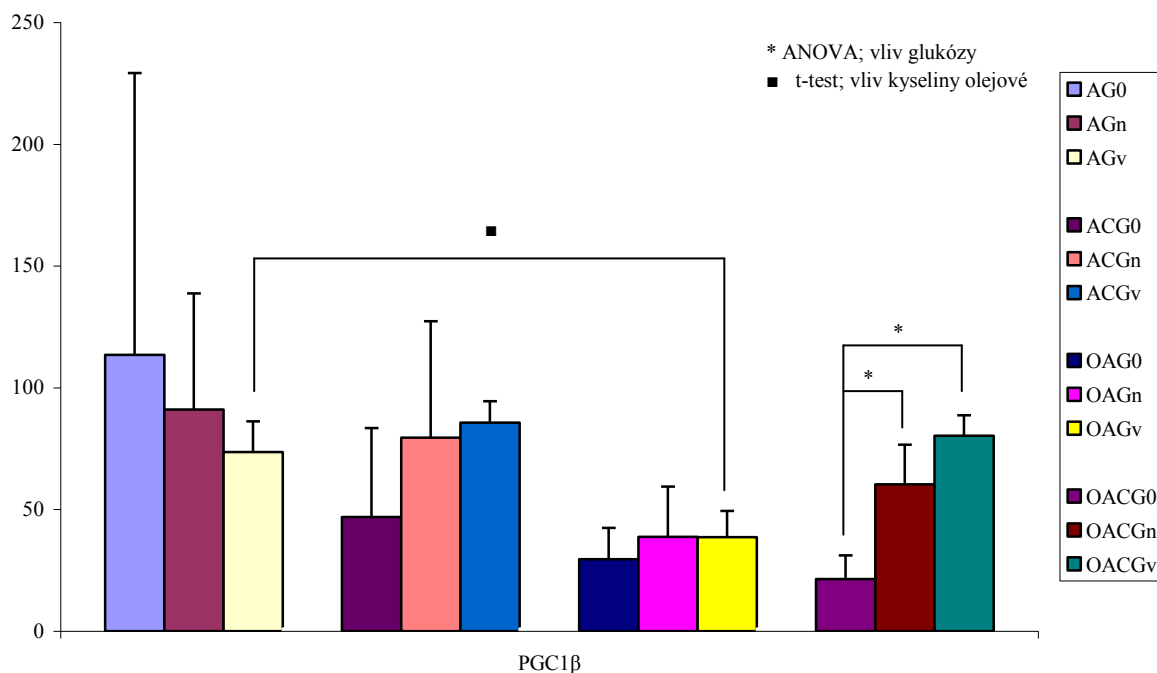
Graf 9: Vliv různé koncentrace glukózy (0; 5,5; 30 mM) v kombinaci s přítomností/absencí kyseliny olejové (300 μ M) na stabilitu mRNA PPAR γ 2 v HepG2 buňkách. Buňky byly inkubovány 4 hodiny v přítomnosti různé koncentrace glukózy a s/bez kyseliny olejové. K buňkám byl přidán 1 hodinu před ukončením experimentu inhibitor transkripce aktinomycin D (A) 4 μ g/ml, případně aktinomycin společně s inhibitorem translace cykloheximidem 1,4 μ g/ml (AC). Data získaná ze vzorků po 3 hodinách inkubace (bez aktinomycinu D) byla použita jako kontrolní hodnoty (100%). Gn - normální glukóza, OGn – normální glukóza a 300 μ M kyselina olejová, G0 – nulová glukóza, OG0 nulová glukóza a 300 μ M kyselina olejová, Gv – vysoká glukóza, OGv - vysoká glukóza a 300 μ M kyselina olejová, A – aktinomycin D, AC – aktinomycin spolu s cykloheximidem. * označuje signifikantní rozdíl mezi vzorky při použití testu ANOVA pro posouzení vlivu různé koncentrace glukózy ($p < 0,05$); ■ označuje signifikantní rozdíl mezi vzorky při použití t -testu pro posouzení vlivu přítomnosti/absence kyseliny olejové ($p < 0,05$).

U koaktivátoru PGC-1 α (Graf 10; viz. níže) byl signifikantní rozdíl 11% způsobený rozdílem v koncentraci glukózy naměřen pouze mezi buňkami inkubovanými s oběma použitými inhibitory bez kyseliny olejové, v médiu s nulovou glukózou (ACG0) a normální glukózou (ACGn); ($p < 0,05$).



Graf 10: Vliv různé koncentrace glukózy (0; 5,5; 30 mM) v kombinaci s přítomností/absencí kyseliny olejové (300 μ M) na stabilitu mRNA PGC1 α v HepG2 buňkách. Buňky byly inkubovány 4 hodiny v přítomnosti různé koncentrace glukózy a s/bez kyseliny olejové. K buňkám byl přidán 1 hodinu před ukončením experimentu inhibitor transkripce aktinomycin D (A) 4 μ g/ml, případně aktinomycin společně s inhibitorem translace cykloheximidem 1,4 μ g/ml (AC). Data získaná ze vzorků po 3 hodinách inkubace (bez aktinomycinu D) byla použita jako kontrolní hodnoty (100%). Gn - normální glukóza, OGn – normální glukóza a 300 μ M kyselina olejová, G0 – nulová glukóza, OG0 nulová glukóza a 300 μ M kyselina olejová, Gv – vysoká glukóza, OGv - vysoká glukóza a 300 μ M kyselina olejová, A – aktinomycin D, AC – aktinomycin spolu s cykloheximidem. * označuje signifikantní rozdíl mezi vzorky při použití testu ANOVA pro posouzení vlivu různé koncentrace glukózy ($p < 0,05$); ■ označuje signifikantní rozdíl mezi vzorky při použití *t*-testu pro posouzení vlivu přítomnosti/absence kyseliny olejové ($p < 0,05$).

Signifikantní rozdíly způsobené různou koncentrací glukózy byly u koaktivátoru PGC-1 β (Graf 11; viz. níže) naměřeny u vzorků kultivovaných v přítomnosti kyseliny olejové, spolu s inhibitory transkripce a translace. Hladiny mRNA se jevily méně stabilní u buněk inkubovaných v podmínkách nulové glukózy (OACG0), u kterých došlo k poklesu na 22% kontrolní hodnoty, v porovnání s normální (OACGn) – 60% a vysokou glukózou (OACGv) – 80% kontrolní hodnoty; ($p < 0,05$).



Graf 11: Vliv různé koncentrace glukózy (0; 5,5; 30 mM) v kombinaci s přítomností/absencí kyseliny olejové (300 μ M) na stabilitu mRNA PGC1 β v HepG2 buňkách. Buňky byly inkubovány 4 hodiny v přítomnosti různé koncentrace glukózy a s/bez kyseliny olejové. K buňkám byl přidán 1 hodinu před ukončením experimentu inhibitor transkripce aktinomycin D (A) 4 μ g/ml, případně aktinomycin společně s inhibitorem translace cykloheximidem 1,4 μ g/ml (AC). Data získaná ze vzorků po 3 hodinách inkubace (bez aktinomycinu D) byla použita jako kontrolní hodnoty (100%). Gn - normální glukóza, OGn – normální glukóza a 300 μ M kyselina olejová, G0 – nulová glukóza, OG0 nulová glukóza a 300 μ M kyselina olejová, Gv – vysoká glukóza, OGv - vysoká glukóza a 300 μ M kyselina olejová, A – aktinomycin D, AC – aktinomycin spolu s cykloheximidem. * označuje signifikantní rozdíl mezi vzorky při použití testu ANOVA pro posouzení vlivu různé koncentrace glukózy ($p < 0,05$); ■ označuje signifikantní rozdíl mezi vzorky při použití *t*-testu pro posouzení vlivu přítomnosti/absence kyseliny olejové ($p < 0,05$).

Pomocí *t*-testu byl u stanovovaných proteinů sledován vliv kyseliny olejové na stabilitu mRNA. U mRNA PPAR- γ 1 nebyla zaznamenána žádná signifikantní změna (viz. Graf 8).

U PPAR- γ 2 (viz. Graf 9) byla signifikantní změna zaznamenána pouze v případě buněk inkubovaných v hyperglykemickém médiu, ke kterému byly hodinu před ukončením pokusu přidány oba použité inhibitory. U buněk, které byly v médiu s kyselinou olejovou (OACGv) byly hladiny mRNA signifikantně nižší o 30% než u buněk bez oleátu (ACGv); ($p < 0,05$).

Stejně tak v případě PGC-1 α (viz. Graf 10) byl signifikantní vliv oleátu na stabilitu mRNA zaznamenán pouze u vzorků získaných z buněk inkubovaných v prostředí s vysokou koncentrací

glukózy, ke kterým byl přidán pouze aktinomycin. Jedná se o pokles hladiny z 65% (AGv) na 52% v přítomnosti kyseliny olejové (OAGv); ($p < 0,05$).

Podobný charakter měl i výsledek naměřený v případě koaktivátoru PGC-1 β (viz. Graf 11). Snížení hladiny mRNA ze 74% kontrolní hodnoty u buněk bez oleátu (AGv) na 39% v přítomnosti kyseliny olejové; ($p < 0,05$).

Výsledky týkající se transkripčních faktorů PPAR a jejich koaktivátorů byly publikovány v práci :
BOGDANOVA*, K., UHERKOVA*, L., POZATKOVA, H., RYPKA, M., VESELY, J. mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptors and their coactivators are affected by glucose deprivation and oleate in human hepatoma HepG2 cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2007, vol. 151, no. 2, s. 237-45.

První dvě autorky se na publikaci podílely stejným dílem.

F. Diskuze

F.1. Stanovení vlivu glykosilovaného albuminu na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B na základě jejich buněčné lokalizace cytosol/jádro

Zvýšené hladiny glukózy – hyperglykémie - podmiňují produkci mitochondriálních ROS (Brownlee 2001) a neenzymatickou glykaci proteinů, jejímž následkem vznikají tzv. produkty pokročilé glykace - AGEs (Brownlee et Cerami 1981; Brownlee 2000).

Podíl AGEs na mnoha patofyziologických procesech je již delší dobu uznávaným faktem. V poslední době však narůstá počet studií podporujících patologický význam tzv. Amadoriho produktů, které představují mezistupeň ve formaci AGEs. Představitelem Amadoriho produktů je např. glykosilovaný albumin.

Glykosilovaný albumin použitý při našem experimentu simuloval stav známý u diabetiků, kdy dochází ve vyšší míře k jeho tvorbě a ukládání (Brownlee 1992). Glukóza, jejíž vysoké koncentrace v plazmě jsou jednou z nejdůležitějších laboratorních diagnostických charakteristik diabetes mellitus, se může neenzymaticky vázat s reaktivními aminokyselinovými skupinami cirkulujících a tkáňových proteinů za vzniku nejprve nestabilních meziproductů (Schiffova base) a později stabilních, tzv. Amadoriho produktů. Z cirkulujících glykosilovaných proteinů tvoří 80% právě glykosilovaný albumin (Cohen 2003).

V rámci práce jsme v buněčné kultuře HepG2 stanovili vliv glykosilovaného albuminu na signalizační kaskádu NF- κ B, která je v organismu velmi důležitá z hlediska prozánětlivého poškození (viz. kapitola literární přehled).

Pomocí Western blottingu a imunodetekce byl na kultuře hepatomových HepG2 buněk sledován vliv glykosilovaného albuminu (500 μ g/ml) na aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B a jeho lokalizaci v buněčných kompartmentech – cytosol/jádro. Rovněž byla sledována cytosolová a jaderná koncentrace inhibičního proteinu I κ B. Během 30 minutové a 4 hodinové inkubace HepG2 buněk s glykosilovaným albuminem nebyla zaznamenána signifikantní změna koncentrace

inhibičního proteinu I κ B v cytosolové/jaderné frakci, ze které bychom mohli usoudit na aktivaci, nebo inhibici NF- κ B.

V případě transkripčního faktoru NF- κ B byla u 4 hodinového pokusu s glykosilovaným albuminem zaznamenána signifikantní změna vůči kontrole, ne však vůči buňkám ovlivněným neglykosilovaným BSA (bovinní sérový albumin). Signifikantní snížení hladin NF- κ B u vzorků ovlivněných po dobu 4 hodin glykosilovaným albuminem vůči 30 minutám by signalizovalo snížení koncentrace transkripčního faktoru v jaderné frakci. Nebylo však zaznamenáno předchozí zvýšení koncentrace NF- κ B v jádře, naznačující aktivaci transkripce, ani změna v případě inhibičního proteinu I κ B – snížení jeho koncentrace v cytosolové frakci a posléze přesun do jádra, které by vysvětlovalo snížení jaderné koncentrace NF- κ B.

Je pravděpodobné, že buněčný mechanismus, kterým glykosilovaný albumin stimuluje signální transdukcí je závislý na použitém buněčném typu. Byly publikovány výsledky, ve kterých byly mnohem nižší koncentrace glykosilovaného albuminu než použité v této práci, dostačující k aktivaci NF- κ B signalizační kaskády v buňkách VSMC (vascular smooth-muscle cells) (De Oliveira et al. 2005). Při studiu vlivu glykosilovaného albuminu na patogenezi neuropatií provázejících diabetes byla koncentrace 500 μ g/ml působící na buňky PTEC (proximal tubular epithelial cells) dostačující k aktivaci NF- κ B a k upregulaci mRNA prozánětlivých cytokinů IL-8 a ICAM-1. Všechny zmíněné molekuly se podílejí na vzniku diabetické neuropatie (Tang et al. 2006). U endotelových buněk HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) byl detekován přesun NF- κ B do jádra po 30 min. ovlivnění 500 μ g/ml glykosilovaným albuminem (Higai et al. 2006). V buňkách srdeční svaloviny indukuje glykosilovaný albumin po 24 hodinové inkubaci a koncentraci 400 μ g/ml produkci ROS, aktivaci PKC a NADPH oxidasy a následně aktivaci NF- κ B (Zhang et al. 2006).

Pro důkaz vlivu glykosilovaného albuminu na HepG2 buňky bude zřejmě potřeba modifikace experimentu, např. úprava koncentrací zkoumané látky, délka působení testované látky, změna detekční metody, aj. v porovnání s podmínkami použitými v naší práci. Dosud však nebyla publikovaná žádná práce, která by se u buněčného typu HepG2 zabývala vlivem glykosilovaného

albuminu na transkripční faktor NF- κ B, případně vlivem na kinázy, které jsou tomuto proteinu v signalizační kaskádě nadřazené, např. PKC či MAPK.

V naší práci jsme se nemohli opřít o dostatečné množství podkladů nejen z hlediska použité buněčné linie, ale i co se týká použití glykosilovaného albuminu jako testované látky, pro který jsme se rozhodli kvůli jeho podílu mezi cirkulujícími glykosilovanými proteiny (viz. výše). Většina dosud publikovaných prací se zabývá vlivem AGEs. Svým působením se Amadoriho produkty podobají AGEs, což mohou potvrdit práce prováděné na mesangiálních a epiteliálních buňkách ledvinných glomerulů, které na zvýšený přísun glykosilovaného albuminu reagovaly tvorbou peroxidu vodíku, jednoho z aktivátorů NF- κ B (Aggarwal et Daniels 1992; Daniels et al. 1993). V pozdějších pracích je zmiňována glykosilovaným albuminem indukovaná aktivace NO-synthasy a produkce NO v buňkách endotelu (Amore et al. 1997). Gen pro NO-syntázu je spuštěn transkripčním faktorem NF- κ B (viz. kapitola literární přehled).

F.2. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B na základě jejich buněčné lokalizace cytosol/jádro

Zvýšené hladiny plazmatických volných mastných kyselin (FFA) zeslabují vliv inzulínu, což představuje rizikový faktor rozvoje inzulínové rezistence a vzniku diabetu druhého typu (Paolisso et al. 1995). V játrech se zvýšené hladiny mastných kyselin podílejí na zeslabení účinku inzulínu, snižují jeho clearance, což přispívá k rozvoji hyperinzulinémie. (Wasada et al. 2008).

Jedním z úkolů práce bylo sledovat vliv kyseliny olejové v přítomnosti různé koncentrace glukózy na aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B v hepatomových buňkách HepG2.

V případě našeho experimentu nebyla u HepG2 buněk vystavených působení vysoké koncentrace glukózy (30 mM) v přítomnosti kyseliny olejové (300 μ M) v časových intervalech 30 minut a 4 hodiny zaznamenána signifikantní změna v jaderné lokalizaci transkripčního faktoru

NF- κ B, která by signalizovala aktivaci jeho transkripčních funkcí. Signifikantní snížení jaderné lokalizace NF- κ B bylo zaznamenáno v případě buněk ovlivněných kyselinou olejovou v přítomnosti nulové hladiny glukózy v porovnání s buňkami inkubovanými v médiu s normální hladinou glukózy a 300 μ M kyselinou olejovou. Tato změna byla naměřena u 30 minutového inkubačního intervalu.

Žádné signifikantní změny v případě buněk ovlivněných vysokou glukózou nebyly zaznamenány ani v jednom ze sledovaných časových intervalů. Nebyly zaznamenány ani signifikantní změny v případě inhibičního faktoru I κ B, které by měly doprovázet výše zmíněný pokles hodnot NF- κ B u buněk v prostředí s nulovou glukózou. Kdyby byla zaznamenána pozitivní změna hodnot naměřených v kombinaci vysoká glukóza + kyselina olejová, pak by teoreticky bylo možné uvažovat o kumulativním charakteru působení glukózy a kyseliny olejové na aktivaci NF- κ B.

Co se týká naměřeného snížení koncentrace NF- κ B v jaderné frakci, na základě předem prostudované literatury jsme očekávali opačný charakter změny, tj. zvýšení koncentrace jaderného NF- κ B jako známku aktivace jeho transkripčních funkcí.

FFA jsou zodpovědné za aktivaci kinázy IKK- β , potřebné k aktivaci NF- κ B. Příčinou aktivace IKK- β je pravděpodobně zvýšená koncentrace volných kyslíkových radikálů (ROS), které jsou produkovány jako následek zvýšené hladiny FFA (Inoguchi et al. 2000). IKK- β může být rovněž přímo aktivovaná jiným typem kinázy – protein kinázou C (PKC) (Altman et al. 2000; Kawakami et al. 2004). PKC- δ se podílí na aktivaci NF- κ B v mnoha různých typech tkání (Kawahara et al. 2006; Zampetaki et al. 2005; Woo et al. 2005; Satoh et al. 2004). V jaterní tkáni byla prokázána její aktivace působením FFA (Chen et al. 2006).

Aktivace transkripčního faktoru NF- κ B má za následek produkci značného množství prozánětlivých cytokinů. Jejich hladiny jsou u obézních jedinců chronicky zvýšené. Z tohoto důvodu se v poslední době rostou tendence uvažovat o obezitě jako o zánětlivém stavu s chronicky aktivovaným imunitním systémem (Tataranni et Ortega 2005). Řada prozánětlivých cytokinů je

zodpovědná za aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B a navíc tento faktor sám aktivuje jejich transkripci (Tak et Firestein 2001; Senftleben et Karin 2002).

Za produkci prozánětlivých cytokinů u obézních jedinců nejsou zodpovědné pouze mastné kyseliny. Působení glukózy v suprafyziologické koncentraci mělo v případě VSMC za následek zvýšenou produkci cytokinu TNF- α se silným prozánětlivým účinkem (Ramana et al. 2007), který se rovněž podílí na aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B.

Je možné, že pro detekci vlivu sledovaných látek na aktivaci NF- κ B je zapotřebí jiná (citlivější) metoda, než jaká byla použita v naší práci. Není pravděpodobné, že by za negativním výsledkem byla nevhodně zvolená buněčná linie, či námi zvolená koncentrace kyseliny olejové a časový rozvrh experimentu, protože např. Vinciguerra et al. (2008) zaznamenal aktivaci NF- κ B v buňkách HepG2 při působení kyseliny olejové již v koncentraci 50 μ M v časovém intervalu 1 hodina.

Při změně námi používaných izolačních a detekčních metod, které se zpočátku zdály jako dostatečné (viz. kapitola výsledky – zavedení metody frakcionace), by pravděpodobně bylo možné dosáhnout výsledků, které by podpořily teorie negativního působení suprafyziologických koncentrací mastných kyselin a glukózy na organismus prostřednictvím signalizační dráhy NF- κ B.

F.3. Stanovení vlivu nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na transkripční faktory PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátory PGC-1 α a PGC-1 β

O tom, jaké budou výsledné hladiny jednotlivých mRNA v buňce rozhodují vzájemně protichůdné procesy syntézy a degradace. S rostoucím množstvím informací je patrné, že do kontroly procesů regulujících genovou aktivitu zasahují nejen dosud prozkoumané obecné regulační mechanismy, jako např. transkripční faktory, ale i nutrienty přijímané potravou. Jedním z úkolů této práce bylo prozkoumat vlivy kyseliny olejové a glukózy na několik členů signalizační kaskády PPAR (peroxisome proliferator activated receptor), a to zejména vzhledem k faktu

trvalého růstu hladin zmíněných látek v plazmě nemocných s civilizačními chorobami. Z doposud známých výsledků můžeme usuzovat na vliv glukózy a kyseliny olejové na mRNA expresi transkripčního faktoru PPAR- γ 1, - γ 2 a jejich koaktivátorů PGC-1 α a -1 β (peroxisome proliferator activated receptor coactivator), a to i za absence hormonů ovlivňujících metabolismus glukózy a mastných kyselin (Desvergne et al. 2006; Herzig et al. 2001; Yoon et al. 2001).

Členové rodiny PPAR intracelulárních transkripčních faktorů hrají důležitou roli v kontrole energetické bilance buňky. Jak ukazují nedávné výsledky, jsou PPAR kromě svých důležitých funkcí v metabolismu mastných kyselin a diferenciaci tukových buněk pravděpodobně také zapojeny do metabolismu sacharidů. PPAR- α může pozitivně ovlivnit regulaci genů účastnících se jaterní glukoneogeneze a přisuzuje se mu tudíž účast v adaptační reakci organismu na hladovění (Hashimoto et al. 2000; Hsu et al. 2001; Kersten et al. 1999; Kersten et al. 2001).

Fujiwara et al. (2003) při pokusech prováděných na kultuře hepatomových buněk HepG2 – stejné kultuře použité při našem experimentu – detekoval redukci v hladině mRNA (1,4 x) u PPAR- α inkubovaných v přítomnosti 10% FBS, normální glukózy a kyseliny olejové o koncentraci 0,25 mM.

Na izoformách PPAR- γ 1 a - γ 2, které jsou rovněž detekovatelné v jaterních buňkách, i když ne v takovém množství jako PPAR- α (Semple et al. 2006), bylo provedeno měření vlivu různé koncentrace glukózy za přítomnosti/absence 300 μ M kyseliny olejové na expresi mRNA.

Z výsledků předkládané práce je patrný vliv deplece glukózy na hladinu mRNA izoformy PPAR- γ 1, u které došlo k signifikantnímu zvýšení exprese po čtyřhodinové inkubaci. V případě PPAR- γ 2 k tomuto jevu nedošlo. Signifikantní zvýšení v expresi PPAR- γ 1 mRNA je rovněž patrné u buněk kultivovaných v experimentálním uspořádání nulová glukóza + kyselina olejová. Stejně, jako v případě nulové glukózy, nebyl v námi prováděných měřeních zaznamenán vliv 300 μ M kyseliny olejové na změny v expresi mRNA izoformy PPAR- γ 2 (Graf 6). K podobným výsledkům dospěl ve své studii i Fujiwara et al. (2003). Na stejné buněčné linii, ale v rozdílném experimentálním uspořádání – inkubace buněk s kyselinou olejovou po dobu 24 hodin – ve své práci detekoval stimulaci mRNA exprese PPAR- γ (bez bližší specifikace u jednotlivých izoform).

Nedávno provedená studie (Edvardsson et al. 2006) zaznamenala podstatné zvýšení hladin PPAR- γ 2 mRNA v izolovaných myších primárních hepatocytech, kterou tyto buňky vykazovaly v reakci na působení kyseliny olejové (0,5 mM), v přítomnosti 0,75% albuminu a 11 mM glukózy.

Rozdílnost jednotlivých výsledků je zřejmě dána použitím jiného buněčného materiálu a rozdíly ve způsobu provedení experimentu (koncentrace testovaných použitých látek, použité inkubační doby).

Celá řada studií (viz. kapitola literární přehled) potvrzuje funkci PGC-1 α a PGC-1 β jako klíčových a na ligandu nezávislých koaktivátorů, jejichž cílem v signalizační kaskádě je např. v naší studii sledovaný jaderný receptor PPAR a mnoho jiných jaderných receptorů. Je možné předpokládat, že funkce těchto koaktivátorů je přísně regulována v závislosti na jejich přítomnosti v jednotlivých typech tkání. Pro experimentální uspořádání naší studie bylo podstatné, že se u obou izoform koaktivátorů prokázala jejich významně zvýšená koncentrace v jaterních buňkách vystavených podmínkám srovnatelným s hladověním. A dále skutečnost, že PGC-1 koaktivátory se podílí na genové regulaci pro buňku klíčových událostí jako jsou biosyntéza mitochondrií, regulace metabolismu mastných kyselin a jaterní glukoneogeneze (Finck et Kelly 2006, Lin et al. 2005, Liang et Ward 2006, Sadana et Park 2007). To, že při našich experimentech došlo ke zvýšení exprese mRNA PGC-1 α v jaterních HepG2 buňkách inkubovaných v mediu se subfyziologickou koncentrací glukózy (bez ohledu na přítomnost či absenci kyseliny olejové) se plně shoduje s prooxidativními (geneze mitochondrií) a glukoneogenetickými funkcemi této izoformy koaktivátoru. Za zmínku rovněž stojí fakt, že u námi sledovaných mRNA se zvýšení exprese (upregulace) projevilo v obou experimentálních časových intervalech (30 minut a 4 hodiny) pouze u izoformy PGC-1 α jako reakce HepG2 buněk čistě na absenci glukózy (viz výše).

Jelikož v našem experimentu nebyly v kultivačním mediu přítomny žádné hormony, můžeme prohlásit, že ke zvýšení koncentrace PGC-1 α mRNA nedošlo exogenní stimulací působením glukokortikoidů, ani dalších hormonů, které spouští aktivaci PGC-1 α pomocí sekundárního posla cAMP. Podle všeho se na aktivaci exprese mRNA PGC-1 α , která se vytrvale drží na vysoké úrovni v případě buněk inkubovaných za podmínek nízké glukózy spolu

s přítomností suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové, spolupodílí dvojí podnět (Graf 6), a to glukoneogenetický stimul nízké koncentrace glukózy v kombinaci s upregulací genů potřebných pro β -oxidaci mastných kyselin, jako reakce na kyselinu olejovou (Zhang et al. 2004).

Co se týká druhé námi sledované izoformy PGC-1 β , podařilo se nám demonstrovat signifikantní zvýšení obsahu mRNA PGC-1 β v HepG2 v přítomnosti kyseliny olejové bez ohledu na fyziologickou či sníženou hladinu glukózy. Toto zvýšení však nemá přetrvávající charakter, jak je tomu v případě izoformy PGC-1 α . K detekci vyšších hodnot jsme dospěli pouze v kratší periodě – 30 minut, ne však u buněk v kultuře vystavené experimentálním podmínkám delšího intervalu (4 hodiny). Navíc vlivem přítomnosti kyseliny olejové došlo k signifikantnímu potlačení výše hladiny mRNA PGC-1 β v případě dlouhodobého působení tohoto nutrietu současně s ochuzením buněčné kultury o významný energetický zdroj – glukózu. Odpověď na otázku proč došlo ke snížení obsahu mRNA PGC-1 β izoformy můžeme hledat v jeho funkcích, které jsou realizované při fyziologických podmínkách. PGC-1 β působí jako efektivní koaktivátor genů zapojených do lipogeneze a genů účastnících se lipoproteinové produkce. V případě aktivace genů řídicích glukoneogenezi je však jeho účinek v porovnání s PGC-1 α podstatně nižší (Finck et Kelly 2006, Lin et al. 2005).

F.4. Vliv nulové, fyziologické a vysoké hladiny glukózy v přítomnosti/absenci suprafyziologické koncentrace kyseliny olejové na *de novo* proteinovou syntézu a mRNA stabilitu transkripčních faktorů PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátorů PGC-1 α a PGC-1 β

Pomocí translačního inhibitoru cykloheximidu jsme zkoumali vliv použitých nutrietů na *de novo* proteinovou syntézu sledovaných izoforem PPAR- γ . Byla pozorována silná indukce mRNA PPAR- γ 2, a to zejména u buněk v přítomnosti nulové a normální glukózy. V případě PPAR- γ 1 byl efekt obdobný, i když ne v zcela porovnatelné míře a pouze u buněk kultivovaných v přítomnosti

glukózy. Tento nále z naznačuje, že přítomnost glukózy ve fyziologické koncentraci či její absence může ovlivnit regulaci transkripce PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 mRNA. Nejen naše výsledky, citované práce, ale i mnoho dalších prací, které zde nejsou zmíněné potvrzují skutečnost, že znalosti všech mechanismů ovlivňujících regulaci exprese izoform PPAR- γ jsou dosud nekompletní.

V naší studii se podařilo prokázat, že u buněk inkubovaných v přítomnosti inhibitoru translace cykloheximidu došlo u obou zkoumaných izoform PGC-1 ke snížení hladin mRNA v případě dlouhodobé (4 hodinové) inkubace, i když nebylo ve všech sledovaných případech signifikantní (Graf 7). Tyto výsledky naznačují možnost, že mRNA těchto koaktivátorů vyžaduje pro udržení své funkce *de novo* proteinovou syntézu, která pravděpodobně poskytuje dosud nedefinované působky podporující stabilitu PGC-1 mRNA.

Je zřejmě zapotřebí dalšího výzkumu k prohloubení poznání týkajícího se funkcí koaktivátorů PGC-1 a všech působků, které ovlivňují mechanismy těchto významných metabolických činitelů.

Spolu s testovanými látkami byl k buněčné kultuře HepG2 přidán aktinomycin D, který nám jako prostředek způsobující inhibici transkripce umožnil prozkoumat vliv testovaných nutrietů na posttranskripční stabilitu mRNA sledovaných proteinů.

U obou sledovaných izoform PPAR- γ je patrný výraznější vliv glukózy na stabilitu mRNA v porovnání s vlivem kyseliny olejové. Pouze u izoformy PPAR- γ 1 je v případě buněk v přítomnosti kyseliny olejové v médiu s vysokou koncentrací glukózy detekované snížení mRNA stability.

V případě PGC-1 α je možno pozorovat vyšší stabilitu u buněk inkubovaných v prostředí s nulovou glukózou v porovnání s buňkami v prostředí s normální a vysokou glukózou – projevuje se tak glukoneogenetická funkce tohoto koaktivátoru. Kyselina olejová signifikantně snižuje stabilitu u buněk inkubovaných v prostředí s vysokou koncentrací glukózy a stejně působí i v případě koaktivátoru PGC-1 α . U tohoto koaktivátoru je nejméně stabilní mRNA v prostředí s nulovou glukózou v přítomnosti kyseliny olejové.

Můžeme prohlásit, že testované látky, tj. kyselina olejová a glukóza mají vliv na *de novo* syntézu a na stabilitu mRNA sledovaných proteinů a práce tak přispěla k hlubšímu pochopení problematiky energetického metabolismu jehož jsou PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátory PGC-1 α a PGC-1 β důležitou součástí.

G. Souhrn dizertační práce

G.1. Úvod:

Výsledky získané molekulárními biology během několika posledních let značně rozšířily znalosti týkající se regulačních mechanismů v buňce. Jedním z takových poznatků byla schopnost molekul, jakými jsou glukóza a mastné kyseliny, zasahovat do řízení energetického metabolismu a zánětlivých procesů. Pokud není zvýšený příjem tohoto typu látek vyvážený dostatečnou fyzickou aktivitou, může se stát příčinou vzniku obezity nabývající v současnosti ve vyspělých zemích epidemických měřítek. Je důležité přesně definovat vliv tohoto typu molekul na energetický a prozáněťový metabolismus buňky řízený transkripčními faktory jako PPAR, jejich koaktivátory a transkripčním faktorem NF- κ B. Transkripční faktory rodiny PPAR jsou klíčové v řízení energetických pochodů – včetně metabolismu lipidů. Při metabolických pochodech řízených činností transkripčního faktoru NF- κ B vzniká, mimo jiné, celá řada látek působících prozáněťově a podporujících vznik oxidačního stresu. Tyto jsou rovněž důležitými faktory v rozvoji inzulinové rezistence.

G.2. Cíle dizertační práce:

Cílem studie bylo rozšířit znalosti týkající se vlivu kyseliny olejové, glukózy a glykosilovaného albuminu, který vzniká v těle při hyperglykémii, na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein I κ B a dále na transkripční faktory PPAR- γ 1, PPAR- γ 2 a jejich koaktivátory PGC-1 α a -1 β .

G.3. Materiály a metodika:

Experimenty byly prováděny na buněčné linii HepG2 (lidský hepatocelulární karcinom). Buňky byly za standardních podmínek kultivovány do zhruba 80% konfluence a poté vystaveny po dobu 30 minut a 4 hodin působení glykosilovaného albuminu, kyseliny olejové, glukózy a inhibitorů transkripce (aktinomycin D) a translace (cykloheximid). Pomocí buněčné frakcionace

byl buněčný obsah ovlivněných HepG2 rozdělen na cytosol a jádra. Následovala SDS-PAGE, Western-blotting, imunodetekce a hodnocení změn pomocí chemiluminiscence. Při hodnocení změn na úrovni mRNA byla použita metoda RT-PCR, naměřené hodnoty byly normalizovány podle referenčních genů. Pro statistické hodnocení výsledků byly použity: statistický program SPSS verze 14, jedno a dvouvýběrový *t*-test, ANOVA a post-hoc analýza na 5% hladině významnosti.

G.4. Výsledky a závěry:

V žádném ze sledovaných časových intervalů nebyla zaznamenána signifikantní změna v buněčné lokalizaci NF- κ B ani jeho inhibičního proteinu, která by signalizovala aktivaci, případně inhibici transkripce jako reakci na působení glykosilovaného albuminu. Pravděpodobnou příčinou je nejspíše použitá buněčná linie, která není dostatečně citlivá na produkci ROS, kterou vyvolává glykosilovaný albumin, jak je tomu u jiných buněčných typů.

Dále byl sledován vliv kyseliny olejové v přítomnosti různé koncentrace glukózy na transkripční faktor NF- κ B a jeho inhibiční protein. V případě inhibičního proteinu I κ B nebyla zaznamenána žádná signifikantní změna ve sledovaných buněčných kompartmentech. U buněk vystavených působení kyseliny olejové bylo naměřeno signifikantní snížení jaderné lokalizaci NF- κ B u 30 minutového pokusu v médiu s nulovou glukózou. Nebyla však zaznamenána změna aktivity u jeho inhibičního proteinu, která by měla změny v koncentracích NF- κ B doprovázet. Byl očekáván spíše opačný charakter změny – tzn. nárůst jaderné lokalizace NF- κ B jako reakce na nefyziologické koncentrace oleátu a glukózy, zejména v kombinaci oleát + vysoká koncentrace glukózy.

U buněk vystavených působení (nebo absenci) kyseliny olejové v přítomnosti různé koncentrace glukózy byl sledován vliv těchto látek na hladinu mRNA proteinů PPAR- γ 1, - γ 2, a jejich koaktivátorů PGC-1 α a -1 β po 30 minutách a 4 hodinách. Účelem bylo prozkoumat působení v potravě se vyskytujících nutrientů jako regulačních mechanismů námi sledované metabolické dráhy. Z výsledků je patrný vliv deplece glukózy na zvýšení hladiny mRNA PPAR- γ 1

v experimentálním uspořádání s nebo bez kyseliny olejové. PGC-1 α a PGC-1 β jsou velice důležité na ligandu nezávislé koaktivátory, jejichž cílem jsou například členové rodiny PPAR. Jejich funkce je závislá na typu tkáně, ve které se nacházejí – v játrech roste jejich koncentrace při hladovění. V našem experimentu jsme zaznamenali zvýšení exprese PGC-1 α u buněk v přítomnosti nulové glukózy v obou časových intervalech bez vnějšího působení hormonální stimulace. To znamená, že samotná glukóza působí jako výrazný stimul. Na výrazné stimulaci buněčného metabolismu se v našem případě rovněž podílí přítomnost kyseliny olejové. V případě exprese koaktivátoru PGC-1 β působí jako silnější stimul přítomnost kyseliny olejové, avšak s časově omezenou efektivitou, u delšího časového intervalu došlo dokonce v kombinaci se subfyziologickou koncentrací glukózy ke snížení exprese. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben fyziologickou funkcí PGC-1 β , která ovlivňuje zejména lipogenezi a produkci lipoproteinů.

Pomocí inhibitoru translace cykloheximidu jsme stanovili vliv syntézy proteinů *de novo* na regulaci exprese PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2 a koaktivátorů PGC-1 α a PGC-1 β . Po 4 hodinách byla u vzorků kultivovaných v přítomnosti glukózy zaznamenána indukce hladin mRNA PPAR- γ 1 vůči kontrole. V případě PPAR- γ 2 došlo ke zvýšení exprese u všech sledovaných skupin. Můžeme tvrdit, že různá koncentrace glukózy má vliv na regulaci transkripce PPAR- γ 1 a - γ 2 mRNA. V případě sledovaných koaktivátorů došlo v přítomnosti inhibitoru translace ke snížení hladin mRNA u 4 hodinového experimentu (ne všechny případy však byly signifikantní). Nabízí se pravděpodobné vysvětlení, že mRNA koaktivátorů potřebuje pro udržení své funkce proteinovou syntézu *de novo*, poskytující jí dosud neznámé molekuly k udržení její stability.

Pomocí inhibitoru transkripce aktinomycinu D jsme sledovali vliv testovaných nutrientů na stabilitu mRNA sledovaných proteinů. Byl pozorován silný vliv glukózy na stabilitu mRNA sledovaných izoform PPAR. Mohli jsme potvrdit glukoneogenetickou funkci koaktivátoru PGC-1 α . V prostředí s nulovou glukózou vykazovala jeho mRNA největší stabilitu, zatímco v prostředí s kyselinou olejovou byla stabilita mRNA výrazně snížena.

Testované látky mají vliv na signalizační dráhy členů rodiny PPAR a jejich koaktivátorů, ovlivňují je *de novo* proteinovou syntézou a působením na stabilitu jejich mRNA. Získané

vědomosti mohou poskytnout záchytné body pro možnost zásahu do procesu regulace metabolických kaskád s možností aplikace ve vývoji terapií jak obezity, tak dalších patofyziologických onemocnění a stavů.

G.5. Klíčová slova: PPAR, PGC, NF- κ B, glukóza, kyselina olejová, obezita, zánět

H. Summary

H.1. Introduction:

The results collected by scientists in the last couple years allowed us to deepen our knowledge about regulatory mechanisms in the cell. One part of these facts was the ability of molecules, such as glucose and fatty acids, to influence the control of energetic metabolism and inflammatory events. The increased uptake of this kind of substances has to be balanced with an appropriate amount of physical activity, otherwise it amplifies the risk of evolving into the state of obesity, which is currently reaching epidemic proportions in developed countries. It is important to define exactly the impact of these molecules on energetic and inflammatory metabolism of the cell which is driven by transcription factors such as PPAR, their coactivators and by transcriptional factor NF- κ B. The family of transcription factors PPAR represents key factors in energetic metabolism regulation – including lipid metabolism. A large set of pro-inflammatory and oxidative-stress elements is produced during metabolic processes controlled by the activity of NF- κ B. Its continuous activity was reported in large number of diseases with inflammatory features and high levels of proinflammatory elements which are also important during insulin resistance development.

H.2. Aims:

We were focusing on the extension of our knowledge concerning effects of oleic acid, glucose and glycated albumin, which is formed within body during hyperglycemia, on transcriptional factor NF- κ B and its inhibitory protein I κ B. Moreover, the impact on transcriptional factors PPAR- γ 1, PPAR- γ 2 and their coactivators PGC-1 α and -1 β was also examined.

H.3. Materials and methods:

HepG2 cells (human hepatocellular carcinoma) were used as experimental cell culture. The cells were grown under standard conditions to about 80% confluence and then exposed with

medium containing glycated albumin, oleic acid, glucose and transcription (actinomycin D) and translation (cycloheximide) inhibitors for periods of 30 minutes and 4 hours. Cytosol and nuclei were separated using cell fractionation, followed by SDS-PAGE, Western blotting and immunodetection. Protein changes were evaluated by chemiluminescence. Changes on mRNA levels were measured by RT-PCR. A normalization factor derived from multiple reference genes measured in the same RNA sample was used to compute the relative expression ratio. The obtained data were statistically processed using t-test, ANOVA, post-hoc analysis and statistical program SPSS version 14. The statistical significance was set at $p < 0,05$.

H.4. Results and conclusions:

There were no significant changes in protein levels neither of transcriptional factor NF- κ B nor its inhibitory protein I κ B, suggesting activation or inhibition of transcription in reaction to treatment with glycated albumin for 30 minutes and 4 hours. We considered the reason for this in the used type of cell line, which is probably not sensitive enough to stimulation with glycated albumin, resulting in the production of ROS as in different cell lines.

In the next setting, cells were placed in medium containing oleic acid and different concentrations of glucose which impact on transcriptional factor NF- κ B and its inhibitory protein was evaluated. In case of inhibitory protein there was no significant change in cytoplasmatic and nuclear fraction. Significant decrease of NF- κ B protein levels were detected in nuclear fraction in the cells treated with oleic acid for 30 minutes in medium without glucose. But the change in concentrations of transcriptional factor wasn't accompanied with supposed changes in its inhibitory protein activity. Moreover, this result opposed our expectation. According to related literature, non-physiological concentrations of glucose and oleate are supposed to induce activation and nuclear translocation of NF- κ B. This should be even more pronounced in cells treated with combination of oleic acid + high glucose concentration.

mRNA levels of PPAR- γ 1, - γ 2 and their coactivators PGC-1 α and -1 β were assessed in cells treated for 30 minutes and 4 hours with/without oleic acid in combination with different

concentrations of glucose. The main aim was to evaluate whether the nutrients, which are commonly present in food, may play role as regulatory molecules and influence observed metabolic pathways. The results show, that zero glucose has increased levels of PPAR- γ 1 mRNA in presence/absence of oleic acid. PGC-1 α a PGC-1 β are very important ligand-independent coactivators and are essential for activation of transcriptional factors and nuclear receptors such as members of PPAR family. Functions of these coactivators are tissue dependent – their levels are elevated in liver tissue during starvation. We detected elevated expression of PGC-1 α in cells treated with medium containing zero glucose, for both time-settings and without additional influence of hormonal stimulation. The conclusion is that glucose solely is sufficient to act as strong stimulus. Also the presence of oleic acid in our experiment is very powerful stimulus of cell metabolism. The impact of oleic acid over glucose is more pronounced in case of PGC-1 β coactivator elevated expression, but its influence is only transient. Moreover, oleic acid significantly suppressed the PGC-1 β mRNA level during prolonged incubation period in the absence of glucose. This is understandable since PGC-1 β acts as effective coactivator of genes involved in lipogenesis and lipoprotein production.

We used cycloheximide as translation inhibitor to assess the influence of *de novo* protein synthesis on gene expression control of PPAR- γ 1 and PPAR- γ 2 and coactivators PGC-1 α and PGC-1 β . After 4 hours of incubation with cycloheximide in presence of glucose the PPAR- γ 1 mRNA induction was detected in comparison to control. In case of PPAR- γ 2 mRNA levels the increase was detected in all experimental patterns. We can say, that different concentration of glucose influence the regulation of PPAR- γ 1 and - γ 2 mRNA expression. In case of coactivators the presence of translation inhibitor caused decrease (but not significant in all cases) of mRNA levels in 4 hour experiment. These findings indicate that mRNAs of coactivators require *de novo* protein synthesis producing so far unknown molecules supporting mRNA stability.

Transcription inhibitor actinomycin D was used to determine influence of tested nutrients on mRNA stability of examined proteins. The stability of PPARs mRNA was highly influenced by glucose. Our experiment confirmed gluconeogenic function of PGC-1 α coactivator - in milieu

without glucose its mRNA showed highest stability, whereas oleic acid significantly lowered mRNA stability.

Tested nutrients can influence signaling pathways of PPAR family members and their coactivators by using *de novo* protein synthesis or affecting their mRNA stability. These findings can be used as handy clues in our attempts to interfere with metabolic regulation and help us to create therapies for disorders such as obesity and related pathophysiological states.

H.5. Keywords: PPAR, PGC, NF- κ B, glucose, oleic acid, obesity, inflammation

I. Seznam použité literatury

ADAMS, J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist*. 2002, vol. 7, no. 1, s. 9-16.

AGGARWAL, M., DANIELS, B. S. Increased uptake of glycated albumin by glomerular mesangial and epithelial cells in situ is accompanied by augmented local production of H2O2 (Abstract). *Clin Res* 1992, vol. 40, s. 179A.

AKAMA, K. T., et al. Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, vol. 95, no. 10, s. 5795-800.

AKAMA, K. T., VAN ELDIK, L. J. Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha)-dependent, and involves a TNFalpha receptor-associated factor- and NFkappaB-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem*. 2000, vol. 275, no. 11, s. 7918-24.

ALCAMÍ, J., et al. Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J*. 1995, vol. 14, no. 7, s. 1552-60.

ALKALAY, I., et al. In vivo stimulation of I kappa B phosphorylation is not sufficient to activate NF-kappa B. *Mol Cell Biol*. 1995, vol. 15, no. 3, s. 1294-301.

ALTMAN, A., ISAKOV, N., BAIER, G. Protein kinase C theta: a new essential superstar on the T-cell stage. *Immunol Today*. 2000, vol. 21, no. 11, s. 567-73.

AMORE, A., Nonenzymatically glycated albumin (Amadori adducts) enhances nitric oxide synthase activity and gene expression in endothelial cells. *Kidney Int*. 1997, vol. 51, no. 1, s. 27-35.

AN, B., et al. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. *Cell Death Differ*. 1998, vol. 5, no. 12, s. 1062-75.

- ANDERSSON, U., SCARPULLA, R. C. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2001, vol. 21, no. 11, s. 3738-49.
- ARANY, Z., et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* 2005, vol. 1, no. 4, s. 259-71.
- ARDITE, E., et al. Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor kappaB in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol.* 1998, vol. 124, no. 3, s. 431-3.
- ARENZANA-SEISDEDOS, F., et al. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci.* 1997, vol. 110, no. Pt 3, s. 369-78.
- ARONICA, S. M., KATZENELLENBOGEN, B. S. Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol.* 1993, vol. 7, no. 6, s. 743-52.
- ATTAR, R. M., et al. Genetic approaches to study Rel/NF-kappa B/I kappa B function in mice. *Semin Cancer Biol.* 1997, vol. 8, no. 2, s. 93-101.
- AUBOEUF, D., et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes.* 1997, vol. 46, no. 8, s. 1319-27.
- AUPHAN, N., et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science.* 1995, vol. 270, no. 5234, s. 286-90.
- AUPPERLE, K. R., et al. NF-kappa B regulation by I kappa B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 1999, vol. 163, no. 1, s. 427-33.
- AWTRY, E. H., LOSCALZO, J. Aspirin. *Circulation.* 2000, vol. 101, no. 10, s. 1206-18.
- BAAR, K., et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.* 2002, vol. 16, no. 14, s. 1879-86.

BAEUERLE, P. A., BALTIMORE, D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappaB transcription factor. *Science*. 1988, vol. 242, no. 4878, s. 540-6.

BAEUERLE, P. A., HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1994, vol. 12, s. 141-79.

BALDWIN, A. S. Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest*. 2001, vol. 107, no. 1, s. 3-6.

BALDWIN, A. S. Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996, vol. 14, s. 649-83.

BARAK, Y., et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, vol. 99, no. 1, s. 303-8.

BARKETT, M., GILMORE, T. D. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999, vol. 18, no. 49, s. 6910-24.

BELLAS, R. E., LEE, J. S., SONENSHEIN, G. E. Expression of a constitutive NF-kappa B-like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1995, vol. 96, no. 5, s 2521-7.

BEN-NERIAH, Y. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol*. 2002, vol. 3, no. 1, s. 20-6.

BÉRAUD, C., HENZEL, W. J., BAEUERLE, P. A. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, vol. 96, no. 2, s. 429-34.

BERGMAN, R. N. Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2006, vol. 14, Suppl 1, s. 16S-19S.

BHALLA, S., et al. Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1alpha. Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J Biol Chem*. 2004, vol.279, no. 43, s. 45139-47

BLANQUART, C., et al. The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mol Endocrinol.* 2004 vol. 18, no. 8, s. 1906-18.

BOCQUEL, M. T., et al. The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res.* 1989, vol 17, no. 7, s. 2581-95.

BODEN, G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp clin endocrinol diabetes.* 2003, vol. 111, no. 3, s. 121-4.

BODEN G., SHULMAN G. I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 2002, vol. 32, Suppl 3, s.14-23.

BONIZZI, G., KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004, vol. 25, no. 6, s. 280-8.

BOWIE, A. G., MOYNAGH, P. N., O'NEILL, L. A. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. Lack of involvement of H₂O₂ in NF-kappaB activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997, vol. 272, no. 41, s. 25941-50.

BRAISSANT, O., et al Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996, vol. 137, no. 1, s. 354-66.

BRANCO, M., et al. 3,5,3'-Triiodothyronine actively stimulates UCP in brown fat under minimal sympathetic activity. *Am J Physiol.* 1999, vol. 276, no. 1 Pt 1, s. E179-87.

BRAND, K., et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest.* 1996, vol. 97, no. 7, s. 1715-22.

BROWN, C. E., et al. The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci.* 2000, vol. 25, no. 1, s. 15-9.

BROWNLEE, M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*. 1992, vol. 15, no. 12, s. 1835–43.

BROWNLEE, M. Negative consequences of glycation. *Metabolism*. 2000, vol. 49, no. 2, suppl. 1, s. 9-13.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001, vol. 414, no. 6865, s. 813,20.

BROWNLEE, M., CERAMI, A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem*. 1981, vol. 50, s. 385-432.

CIECHANOVER, A., et a. Mechanisms of ubiquitin-mediated, limited processing of the NF-kappaB1 precursor protein p105. *Biochimie*. 2001, vol. 83, no. 3-4, s. 341-9.

COHEN, M. P. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch Biochem Biophys*. 2003, vol. 419, no. 1, s. 25-30.

COLLINS, T., CYBULSKY, M. I. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. 2001, vol. 107, no. 3, s. 255-64.

COLWELL, J. A. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events. *Drugs Today (Barc)*. 2006, vol. 42, no. 7, s. 467-79.

COMINACINI, L., et al. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2000, vol 275, no. 17, s. 12633-8.

CZUBRYT, M. P., et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, vol 100, no. 4, s. 1711-6.

DAITOKU, H., et al. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes*. 2003, vol 52, no. 3, s. 642-9.

DALTON, T. P., SHERTZER, H. G., PUGA, A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999, vol. 39, s. 67-101.

DANIELS, B. S., BRANDT, R. C., AGGARWAL, M. Increased glomerular H₂O₂ production in diabetes: Role of glycated proteins (Abstract). *J Am Soc Nephrol* 1993, vol. 4, s. 791A.

DELHASE, M., et al. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science*. 1999, vol 284, no. 5412, s. 309-13.

DELIC, J., et al. The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF- α -initiated apoptosis. *Br J Cancer*. 1998, vol 77, no. 7, s. 1103-7.

DE OLIVEIRA, C., et al. Insulin alters nuclear factor- λ B and peroxisome proliferator-activated receptor- γ protein expression induced by glycated bovine serum albumin in vascular smooth-muscle cells *J Lab Clin Med*. 2005, vol. 145, no. 3, s. 144-50.

DESVERGNE, B., MICHALIK, L., WAHLI, W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev*. 2006, vol. 86, no. 2, s. 465-514.

DIDONATO, J. A., MERCURIO, F., KARIN, M. Phosphorylation of I κ B α precedes but is not sufficient for its dissociation from NF- κ B. *Mol Cell Biol*. 1995, vol. 15, no. 3, s. 1302-11.

DONOVAN, C. E., et al. NF- κ B/Rel transcription factors: c-Rel promotes airway hyperresponsiveness and allergic pulmonary inflammation. *J Immunol*. 1999, vol 163, no. 12, s. 6827-33.

DREWES, G. MARKing tau for tangles and toxicity. *Trends Biochem Sci*. 2004, vol. 29, no. 10, s. 548-55.

DREXLER, H. C. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, vol. 94, no. 3, s. 855-60.

DREYER, C., et al Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 1992, vol 68, no. 5, s. 879-87.

DUBOIS, M., et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in normal human pancreatic islet cells. *Diabetologia*. 2000, vol.43, no. 9, s. 1165-9.

DUPLUS, E., FOREST, C. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem Pharmacol.* 2002, vol. 64 no 5-6, s. 893–901.

DYNLACHT, B. D., HOEY, T., TJIAN, R. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell.* 1991, vol 66, no. 3, s 563-76.

EDVARDSSON, U., LJUNGBERG, A., OSCARSSON, J. Insulin and oleic acid increase PPARgamma2 expression in cultured mouse hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, vol. 340, no. 1, s. 111-7.

EDVARDSSON, U., et al. PPAR α activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes. *J Lipid Res.* 2006, vol. 47, no. 2, s. 329–40.

EGEA, P. F., KLAHOLZ, B. P., MORAS, D. Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Lett.* 2000, vol. 476, no. 1-2, s. 62-7.

EMMERICH, F., et al. Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood.* 1999, vol. 94, no. 9, s. 3129-34.

ESTERBAUER, H., et al. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics.* 1999, vol. 62, no. 1, s. 98-102.

FAJAS, L., FRUCHART, J. C., AUWERX, J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 1998, vol. 438, no. 1-2, s. 55-60.

FAJAS, L., et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 1997, vol 272, no. 30, s. 18779-89.

FAJAS, L., et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol.* 1999, vol. 19, no. 8, s. 5495-503.

- FAN, M., et al. Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. *Genes Dev.* 2004, vol. 18, no. 3, s. 278-89.
- FEIGE, J. N., AUWERX, J. Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol.* 2007, vol. 17, no. 6, s. 292-301.
- FERNANDEZ, M. L. The metabolic syndrome. *Nutr Rev.* 2007, vol. 65, no. 6 Pt 2, s. S30-4.
- FERRAN, C., et al. Inhibition of NF-kappa B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995, vol. 214, no. 1, s. 212-23.
- FINCK, B. N., et al. Regulatory networks controlling mitochondrial energy production in the developing, hypertrophied, and diabetic heart. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2002, vol. 67, s. 371-82.
- FINCK, B. N., KELLY, D. P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.* 2006, vol. 116, no. 3, s. 615-22.
- FRANZOSO, G., et al. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev.* 1997, vol. 11, no. 24, s. 3482-96.
- FUJIWARA, Y., et al. Analysis of comprehensive effects of polyunsaturated fatty acid on mRNA expression using a gene chip. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2003, vol. 49, no. 2, s. 125-32.
- GAVRILOVA, O., et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem.* 2003, vol. 278, no. 36, s. 34268-76.
- GHOSH, S., MAY, M. J., KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998, vol. 16, s. 225-60.
- GIUSTI, V., et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women. *Diabetes.* 2003 vol.52, no. 7, s. 1673-6.

- GONZALEZ, F. J., PETERS, J. M., CATTLEY, R. C. Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *J Natl Cancer Inst.* 1998, vol. 90, no. 22, s. 1702-9.
- GOTO, M., et al. cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, vol. 274, no. 2, s. 350-4.
- GRAVES, R. A., TONTONOZ, P., SPIEGELMAN, B. M. Analysis of a tissue-specific enhancer: ARF6 regulates adipogenic gene expression. *Mol Cell Biol.* 1992, vol. 12, no. 3, s. 1202-8.
- GRUNSTEIN, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 1997, vol. 389, no. 6649, s. 349-52.
- HAN, Z., et al. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity.* 1998, vol. 28, no. 4, s. 197-208.
- HANDSCHIN, C., et al. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, vol 100, no. 12, s. 7111-6.
- HANSEN, J. B., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem.* 2001, vol 276, no. 5, s. 3175-82.
- HART, L. A., et al. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998, vol. 158, no. 5 Pt 1, s. 1585-92.
- HASLAM, D. W., JAMES, W. P. Obesity. *Lancet.* 2005; vol. 366, no. 9492, s. 1197-09.
- HASHIMOTO, T., et al. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor α -inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J Biol Chem.* 2000, vol. 275, no. 37, s. 28918-28.
- HOSSAIN, M. D., et al. Obesity and diabetes in the developing world – a growing challenge. *N Engl J Med.* 2007, vol. 356, no. 3, s. 213-5.

HAYASHI, T., SEKINE, T., OKAMOTO, T. Identification of a new serine kinase that activates NF kappa B by direct phosphorylation. *J Biol Chem.* 1993, vol. 268, no. 35, s. 26790-5.

HAYDEN, M. S., GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004, vol. 18, no. 18, s. 2195-224.

HERZIG, S., et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* 2001, vol 413, no. 6852, s. 179-83.

HESS, R., STÄUBLI, W., RIESS, W. Nature of the hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature.* 1965, vol. 208, no. 5013, s. 856-8.

HIGAI, K., SHIMAMURA, A., MATSUMOTO, K. Amadori-modified glycated albumin predominantly induces E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells through NADPH oxidase activation. *Clin Chim Acta.* 2006, vol. 367, no. 1-2, s. 137-43.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J.* 1990, vol. 4, no. 11, s. 2890-8.

HIRANO, M., et al. MEK kinase is involved in tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation and degradation of IkappaB-alpha. *J Biol Chem.* 1996, vol. 271, no. 22, s. 13234-8.

HIURA, T. S., KEMPIAK, S. J., NEL, A. E. Activation of the human RANTES gene promoter in a macrophage cell line by lipopolysaccharide is dependent on stress-activated protein kinases and the IkappaB kinase cascade: implications for exacerbation of allergic inflammation by environmental pollutants. *Clin Immunol.* 1999, vol. 90, no. 3, s. 287-301.

HOFMANN, M. A., et al. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB. *Diabetologia.* 1999, vol. 42, no. 2, s. 222-32.

HSU, M. H., et al. Identification of Peroxisome Proliferator-responsive Human Genes by Elevated Expression of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor α in HepG2 Cells. *J Biol Chem.* 2001, vol. 276, no. 30, s. 27950-8.

HU, Y., et al. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science.* 1999, vol. 284. no. 5412, s. 316-20.

HUANG, T. T., et al. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, vol. 97, no. 3, s. 1014-9.

HUSS, J. M., KOPP, R. P., KELLY, D. P. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α (PGC-1 α) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor- α and - γ . Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1 α . *J Biol Chem*. 2002, vol. 277, no. 43, s. 40265-74.

CHAWLA, A., et al. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. 2001, vol. 294, no. 5548, s. 1866-70.

CHEN, C. C., MANNING, A. M. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: a dominant role for NF- κ B. *Agents Actions Suppl*. 1995, vol. 47, s. 135-41.

CHEN, S., et al. Oleate-induced decrease in hepatocyte insulin binding is mediated by PKC- δ . *Biochem Biophys Res Commun*. 2006, vol 346, no. 3, s. 931-7.

CHINETTI, G., et al. Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*. 1998, vol. 273, no. 40, s. 25573-80.

CHIO, C. C., et al. PKA-dependent activation of PKC, p38 MAPK and IKK in macrophage: implication in the induction of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 by dibutyryl cAMP. *Cell Signal*. 2004, vol. 16, no. 5, s. 565-75.

CHO, S., et al. Glutathione downregulates the phosphorylation of I κ B: autoloop regulation of the NF- κ B-mediated expression of NF- κ B subunits by TNF- α in mouse vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, vol, 253, no. 1, s. 104-8.

IJIMA, K., et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, vol. 247, no. 2, s. 353-6.

INOGUCHI, T., et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000, vol 49, no. 11, s. 1939-45.

INOUE, I., et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, vol. 246, no. 2, s. 370-4.

ISOMAA, B., et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2001, vol. 24, no. 4, s. 683-9.

ISSEMANN, I., GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990, vol. 347, no. 6294, s. 645-50.

JOHNSON, C., VAN ANTWERP, D ., HOPE, T. J. An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *EMBO J.* 1999, vol. 18, no. 23, s. 6682-93.

JOW, L., MUKHERJEE, R. The human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtype NUC1 represses the activation of hPPAR alpha and thyroid hormone receptors. *J Biol Chem.* 1995, vol. 270, no. 8, s. 3836-40.

JUMP, B. D. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol.* 2002, vol. 13, no. 2, s. 155-64.

KABE, Y., et al. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal.* 2005, vol. 7, no. 3-4, s. 395-403.

KABIR, M., et al. Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005, vol. 288, no. 2, s. E454-61.

KAJITA, K., et al. Dehydroepiandrosterone down-regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipocytes. *Endocrinology.* 2003, vol. 144, no. 1, s. 253-9.

KAMEI, Y., et al. PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, vol. 100, no. 21, s. 12378-83.

KARIN, M., BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000, vol. 18, s. 621-63.

KASIBHATLA, S., et al DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell.* 1998, vol. 1, no. 4, s. 543-51.

KAWAKAMI, Y., et al. Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J Biol Chem.* 2004, vol. 279, no. 46, s. 47720-5.

KAWAKAMI, Y., et al. Transcriptional coactivator PGC-1alpha regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, vol.102, no. 7, s. 2414-9.

KEMP, T. J., CAUSTON, H. C., CLERK, A. Changes in gene expression induced by H(2)O(2) in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 vol. 307, no. 2, s. 416-21.

KERSTEN, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2001, vol. 2, no. 4, s. 282-6.

KERSTEN, S., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest.* 1999, vol. 103, no. 11, s. 1489-98.

KERSTEN, S., et al. The peroxisome proliferator-activated receptor α regulates amino acid metabolism. *FASEB J.* 2001, vol. 15, no. 11, s. 1971-8.

KHARITONOV, S. A., et al. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *LANCET.* 1994, vol. 343, no. 8890, s. 133-5.

KIM, J. B., SPIEGELMAN, B. M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 1996, vol. 10, no. 9, s. 1096-107.

KLIEWER, S. A., et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res.* 2001, vol. 56, no. 1, s. 239-63.

KNUTTI, D., KAUL, A., KRALL, I A. A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol Cell Biol.* 2000, vol. 20, no. 7, s. 2411-22.

- KNUTTI, D., KRESSLER, D., KRALLI, A. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, vol. 98, no. 17, s. 9713-8.
- KOO, S. H., et al. PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. *Nat Med*. 2004, vol. 10, no. 5, s. 530-4.
- KOPP, E. B., GHOSH, S. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol*. 1995, vol. 58, s. 1-27.
- KORDES, U., et al. Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia*. 2000, vol. 14, no. 3, s. 399-402.
- KRESSLER, D., et al. The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem*. 2002, vol. 277, no. 16, s. 13918-25.
- KUBOTA, N., et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*. 1999, vol. 4, no. 4, s. 597-609.
- KUCHARCZAK, J., et al. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2003, vol. 22, no. 56, s. 8961-82.
- KUWAHARA, I., et al. Neutrophil elastase induces IL-8 gene transcription and protein release through p38/NF- κ B activation via EGFR transactivation in a lung epithelial cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006, vol. 291, no. 3, s. L407-16.
- LAAKSONEN, D. E., et al. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol* 2002, vol. 156, no. 11, s. 1070-7.
- LAVON, I., et al. High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation. *Nat Med*. 2000, vol. 6, no. 5, s. 573-7.
- LEE, F. S., et al. Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell*. 1997, vol. 88, no. 2, s. 213-22.

LEHMAN, J. J., KELLY, D. P. Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth. *Heart Fail Rev.* 2002, vol. 7, no. 2, s. 175-85.

LEHMAN, J. J., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest.* 2000, vol. 106, no. 7, s. 847-56.

LEMBERGER, T., et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem.* 1996, vol. 271, no. 3, s. 1764-9.

LEMBERGER, T., et al. Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids. *J Biol Chem.* 1994, vol. 269, no. 40, s. 24527-30.

LEONE, T. C., et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.* 2005, vol. 3, no. 4, s. e101.

LI, Q., VERMA, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002, vol. 2, no. 10, s. 725-34.

LI, Z. W., et al. The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med.* 1999, vol. 189, no. 11, s. 1839-45.

LI, Z., NABEL, G. J. A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription. *Mol Cell Biol.* 1997, vol. 17, no. 10, s. 6184-90.

LIANG, H., WARD, W. F. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.* 2006, vol. 30, no. 4, s. 145-51.

LIM, H., et al. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev.* 1999, vol. 13, no. 12, s. 1561-74.

LIN, L., DEMARTINO, G. N., GREENE, W. C. Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell.* 1998, vol. 92, no. 6, s. 819-28.

LIN, J., et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell.* 2004, vol. 119, no. 1, s. 121-35.

LIN, J., et al. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell*. 2005, vol. 120, no. 2, s. 261-73.

LIN, J., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem*. 2002, vol. 277, no. 3, s. 1645-8.

LIN, J., et al. PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem*. 2003, vol. 278, no. 33, s. 30843-8.

LIN, J., et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002, vol. 418, no. 6899, s. 797-801.

LIN, J., HANDSCHIN, C., SPIEGELMAN, B.M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabol*. 2005, vol. 1, no. 6, s. 361-70.

LORENZO, C., et al. The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study. *Diabetes Care*. 2003, vol. 26, no. 11, s. 3153-9.

LOVISCACH, M., et al. Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. *Diabetologia*. 2000, vol. 43, no. 3, s. 304-11.

MALEK, S., et al. IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem*. 2001, vol. 276, no. 48, s. 45225-35.

MANGELSDORF, D. J., EVANS, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. 1995, vol. 83, no. 6, s. 841-50.

MATTSON, M. P., CAMANDOLA, S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest*. 2001, vol. 107, no. 3, s. 247-54.

MCDONNELL, D. P., et al. Elucidation of the molecular mechanism of action of selective estrogen receptor modulators. *Am J Cardiol*. 2002, vol. 90, no. 1A, s. 35F-43F.

MCMASTER, A., RAY, D. W. Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. *Exp Physiol.* 2007, vol. 92, no. 2, s. 299-309.

MERCIER, P.A., WINEGARDEN, N. A., WESTWOOD, J. T. Human heat shock factor 1 is predominantly a nuclear protein before and after heat stress. *J Cell Sci.* 1999, vol.112, no. 16, s. 2765-74.

MERCURIO, F., et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science.* 1997, vol. 278, no. 5339, s. 860-6.

MEYER, M. E., et al. Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell.* 1989, vol. 57, no. 3, s. 433-42.

MIAGKOV, A. V., et al. NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, vol. 95, no. 23, s. 13859-64.

MICHAEL, L. F., et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, vol. 98, no. 7, s. 3820-5.

MICHALIK, L., et al. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol.* 2001, vol. 154, no. 4, s. 799-814.

MITCHELL, P. J., TJIAN, R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* 1989, vol. 245, no. 4916, s. 371-8.

MIYAZAWA, K., et al. Constitutive transcription of the human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-kappaB and CBF1. *Am J Pathol.* 1998, vol. 152, no. 3, s. 793-803.

MOERMAN, A. M., et al. Characterization of a neuronal kappaB-binding factor distinct from NF-kappaB. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999, vol. 67, no. 2, s. 303-15.

MONSALVE, M., et al. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell.* 2000, vol. 6, no. 2, s. 307-16.

MOSIALOS, G. The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin Cancer Biol.* 1997, vol. 8, no. 2, s. 121-9.

NAKAMUTA, M., et al. Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med.* 2005, vol. 16, no. 4, s. 631-5.

NEURATH, M. F., et al. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1998, vol. 859, s. 149-59.

ORLOWSKI, R. Z., et al. Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res.* 1998, vol. 58, no. 19, s. 4342-8.

ORPHANIDES, G., LAGRANGE, T., REINBERG, D. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 1996, vol. 10, no. 21, s. 2657-83.

OZAKI, M., et al. Overexpression of redox factor-1 protects against postischemic liver injury by reducing oxidative stress and NF-kappa B activity. *Transplant Proc.* 2002, vol. 34, no. 7, s. 2640-2.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999, vol. 18, no. 49, s. 6853-66.

PANDE, V., RAMOS, M. J. Nuclear factor kappa B: a potential target for anti-HIV chemotherapy. *Curr Med Chem.* 2003, vol. 10, no. 16, s. 1603-15.

PANDE, V., RAMOS, M. J. NF-kappaB in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors. *Curr med Chem.* 2005, vol 12, no. 3, s. 357-74.

PAOLISSO, G., et al. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia.* 1995, vol. 38, no. 10, s. 1213-17.

PATEL, A., et al. Herpes simplex type 1 induction of persistent NF-kappa B nuclear translocation increases the efficiency of virus replication. *Virology.* 1998, vol. 247, no. 2, s. 212-22.

PAZIN, M. J., KADONAGA, J. T. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell.* 1997, vol. 89, no. 3, s. 325-8.

PETERS, J. M., et al. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol.* 2000, vol. 20, no. 14, s. 5119-28.

PETERSEN, K. F., et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, vol. 104, no. 31, s.12587-94.

PHAM, T. A., et al. Ligand-dependent and -independent function of the transactivation regions of the human estrogen receptor in yeast. *Mol Endocrinol.* 1992, vol. 6, no. 7, s. 1043-50.

PILEGAARD, H., SALTIN, B., NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2003, vol. 546, no. Pt 3, s. 851-8.

PUIGSERVER, P., et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998, vol. 92, no. 6, s. 829-39.

PUIGSERVER, P., et al. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell.* 2001, vol. 8, no. 5, s. 971-82.

PUIGSERVER, P., et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature.* 2003, vol. 423, no. 6939, s. 550-5.

PUIGSERVER, P., et al. Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science.* 1999, vol. 286, no. 5443, s. 1368-71.

RABBI, M. F., et al The cAMP-dependent protein kinase A and protein kinase C-beta pathways synergistically interact to activate HIV-1 transcription in latently infected cells of monocyte/macrophage lineage. *Virology.* 1998, vol. 245, no. 2, s. 257-69.

RAHMAN, A., et al. Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF-kappa B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion. *J Immunol.* 1999, vol. 162, no. 9, s. 5466-76.

RAJKUMAR, S. V., et al. Proteasome inhibition as novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol.* 2005, vol. 23, no. 3, s. 630-9.

RAJU, P. A., et al Glutathione precursor and antioxidant activities of N-acetylcysteine and oxothiazolidine carboxylate compared in in vitro studies of HIV replication. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994, vol. 10, no. 8, s. 961-7.

RAMANA, K. V., et al Aldose reductase-regulated tumor necrosis factor-alpha production is essential for high glucose-induced vascular smooth muscle cell growth. *Endocrinology*. 2007, vol. 148, no. 9, s. 4371-84.

RAYET, B., GÉLINAS, C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*. 1999, vol. 18, no. 49, s. 6938-47.

REDDY, J. K., LALWAI, N. D. Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *Crit Rev Toxicol*. 1983, 12, no. 1, s. 1-58.

RENKAWITZ, R. Transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Genet*. 1990, vol. 6, no. 6, s. 192-7.

RHEE, J., et al. Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, vol. 100, no. 7, s. 4012-7.

ROBSON, H., et al. Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids, and thyroid hormones during skeletal growth. *Pediatr Res*. 2002, vol. 52, no. 2, s. 137-47.

ROBYR, D., WOLFFE, A. P., WAHLI, W. Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol*. 2000, vol. 14, no. 3, s. 329-47.

RODGERS, J. T., et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. 2005, vol. 434, no. 7029, s. 113-8.

ROEDER, R. G. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*. 1996, vol. 21, no. 9, s. 327-35.

ROMASHKOVA, J. A., MAKAROV, S. S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*. 1999, vol. 401, no. 6748, s. 86-90.

ROSENFELD, M. G., LUNYAK, V. V., GLASS, C. K. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* 2006, vol. 20, no. 11, s. 1405-28.

ROTHWARF, D. M., KARIN, M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE.* 1999, vol. 1999, no. 5, s. RE1.

RUSSELL, A. P., et al. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes.* 2003, vol. 52, no. 12, s. 2874-81.

SADANA, P., PARK, E. A. Characterization of the transactivation domain in the peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator (PGC-1). *Biochem J.* 2007, vol. 403, no. 3, s. 511-8.

SAKURAI, H., et al. Activation of transcription factor NF-kappa B in experimental glomerulonephritis in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1996, vol. 1316, no. 2, s. 132-8.

SAPOLSKY, R. M., ROMERO, L. M., MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000, vol. 21, no. 1, s. 55-89.

SATO A, et al. PKC-delta and -epsilon regulate NF-kappaB activation induced by cholecystokinin and TNF-alpha in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004, vol. 287, no. 3, s. G582-91.

SEMPLE, R. K., CHATTERJEE, V. K., O'RAHILLY, S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest.* 2006, vol. 116, no. 3, s. 581-9.

SEN, C. K., et al. A positively charged alpha-lipoic acid analogue with increased cellular uptake and more potent immunomodulatory activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, vol. 247, no. 2, s. 223-8.

SEN, R., BALTIMORE, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986, vol. 47, no. 6, s. 921-8.

SENFLEBEN, U., et al. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science*. 2001, vol. 293, no. 5534, s. 1495-9.

SENFLEBEN, U., KARIN, M. The IKK/NF- κ B pathway. *Crit Care Med*. 2002, vol. 30, no. 1 Suppl, s. S18-26.

SHEPPARD, K. A., et al. Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem*. 1998, vol. 273, no. 45, s. 29291-4.

SHI, Y., HON, M., EVANS, R. M. The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, vol. 99, no. 5, s. 2613-8.

SHIMADA, T., et al. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to I κ B kinases. *Int Immunol*. 1999, vol. 11, no. 8, s. 1357-62.

SCHADINGER, S. E., et al. PPAR γ 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005, vol. 288, no. 6, s. E1195-205.

SCHAEFFER, P. J., et al. Calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase activate distinct metabolic gene regulatory programs in cardiac muscle. *J Biol Chem*. 2004, vol. 279, no. 38, s. 39593-603.

SCHEINMAN, R. I., et al. Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*. 1995, vol. 270, no. 5234, s. 283-6.

SCHMIDT, A., et al. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol*. 1992, vol. 6, no. 10, s. 1634-41.

SCHOTTELIUS, A. J., et al. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of κ B kinase activity and nuclear factor κ B DNA binding. *J Biol Chem*. 1999, vol. 274, no. 45, s. 31868-74.

SCHRECK, R., RIEBER, P., BAEUERLE, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J*. 1991, vol. 10, no. 8, s. 2247-58.

SCHRECK, R., et al. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med.* 1992, vol. 175, no. 5, s. 1181-94.

SCHREIBER, S. N., et al. The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J Biol Chem.* 2003, vol. 278, no. 11, s. 9013-8.

SIEBENLIST, U., FRANZOSO, G., BROWN, K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol.* 1994, vol. 10, s. 405-55.

SILVERMAN, N., MANIATIS, T. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* 2001, vol. 15, no. 18, s. 2321-42.

SPIEGELMAN, B. M., FLIER, J. S. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell.* 1996, vol. 87, no. 3, s. 377-89.

SPIEGELMAN, B. M., HEINRICH, R. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell.* 2004, vol. 199, no. 2, s. 157-67.

STAELS, B., et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature.* 1998, vol. 393, no. 6687, s. 790-3.

STAIGER, H., et al. Fatty acid-induced differential regulation of the genes encoding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha and -1beta in human skeletal muscle cells that have been differentiated in vitro. *Diabetologia.* 2005 vol. 48, no. 10, s. 2115-8.

ST-PIERRE, J., et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem.* 2003, vol. 278, no. 29, s. 26597-603.

SURAPUREDDI, S., et al. Identification of a transcriptionally active peroxisome proliferator-activated receptor alpha -interacting cofactor complex in rat liver and characterization of PRIC285 as a coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, vol. 99, no. 18, s. 11836-41.

TAK, P. P., et al. p53 overexpression in synovial tissue from patients with early and longstanding rheumatoid arthritis compared with patients with reactive arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1999, vol. 42, no. 5, s. 948-53.

TAK, P. P., FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 2001, vol. 107, no. 1, s. 7-11.

TAN, N. S., et al. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev.* 2001, vol. 15, no. 24, s. 3263-77.

TANG, S. C., et al. Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy and the role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist. *J Am Soc Nephrol.* 2006, vol. 17, no. 6, s. 1633-43.

TATARANNI, P. A., ORTEGA, E. A burning question: does an adipokine-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes? *Diabetes.* 2005, vol 54, no. 4, s. 917-27.

TAYLOR, E. B., et al. Endurance training increases skeletal muscle LKB1 and PGC-1alpha protein abundance: effects of time and intensity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005, vol. 289, no. 6, s. E960-8.

TERADA, S., et al. Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1alpha protein expression in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 2005, vol. 184, no. 1, s. 59-65.

TERADA, S., et al. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, vol. 296, no. 2, s. 350-4.

TERADA, S., TABATA, I. Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1 alpha protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004, vol. 286, no. 2, s. E208-16.

TEYSSIER, C., et al. Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. *Genes Dev.* 2005, vol. 19, no. 12, s. 1466-73.

THOMPSON, J. E., et al. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell.* 1995, vol. 80, no. 4, s. 573-82.

THORP, J. M., WARING, W. S. Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate. *Nature*. 1962, vol. 194, s. 948-9.

TCHEREPANOVA, I., et al. Modulation of estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1. *J Biol Chem*. 2000, vol. 275, no. 21, s. 16302-8.

TOJIMA, Y., et al. NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature*. 2000, vol. 404, no. 6779, s. 778-82.

TONTONOZ, P., HU, E., SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994, vol. 79, no. 7, s. 1147-56.

TRAENCKNER, E. B., et al. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J*. 1995, vol. 14, no. 12, s. 2876-83.

TSAO, P. W., et al. The effect of dexamethasone on the expression of activated NF-kappa B in adjuvant arthritis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997, vol. 83, no. 2, s. 173-8.

VAN ANTWERP, D. J., et al. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science*. 1996, vol. 274, no. 5288, s. 787-9.

VEGA, R. B., HUSS, J. M., KELLY, D. P. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*. 2000, vol. 20, no. 5, s. 1868-76.

VERMA, I. M., et al. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*. 1995, vol. 9, no. 22, s. 2723-35.

VIDAL-PUIG, A. J., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest*. 1997, vol. 99, no. 10, s. 2416-22.

VIDAL-PUIG, A., et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest*. 1996, vol. 97, no. 11, s. 2553-61.

- VINCIGUERRA, M., et al. PTEN down-regulation by unsaturated fatty acids triggers hepatic steatosis via an NF-kappaBp65/mTOR-dependent mechanism. *Gastroenterology*. 2008, vol. 134, no. 1, s. 268-80.
- VIGRIN, S. E., SCHMITKE, J. A. Metabolic syndrome. *AAOHN*. 2003, vol. 51, no. 1, s. 28,37.
- VLISSARA, H. Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment. *Ann N Y Acad Sci*. 2005, vol. 1043, s. 452-60.
- WANG, C. Y., MAYO, M. W., BALDWIN, A. S. JR. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*. 1996, vol. 274, no. 5288, s. 784-7.
- WANG, C. Y., et al. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med*. 1999, vol. 5, no. 4, s. 412-7.
- WANG, Z., et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*. 2003, vol. 423, no. 6939, s. 555-60.
- WANG, C. Y., et al. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998, vol. 281, no. 5383, s. 1680-3.
- WANG, Y. X., et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003, vol. 113, no. 2, s. 159-70.
- WÄRNMARK, A., et al. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol*. 2003, vol. 17, no. 10, s. 1901-9.
- WASADA, T., et al. Hepatic steatosis rather than visceral adiposity is more closely associated with insulin resistance in the early stage of obesity. *Metabolism*. 2008, vol. 57, no. 7, s. 980-5.
- WASSINK, A. M. J., OLIJHOEK, J. K., VISSEREN, F. L. J. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *European Journal of Clinical Investigation* 2007, vol. 37, no. 1, s. 8-17.
- WENDE, A. R., et al. PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol*. 2005, vol. 25, no. 24, s. 10684-94.

WILSON, F. H., et al. A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. *Science*. 2004, vol. 306, no. 5699, s. 1190-4.

WORKMAN, J. L., KINGSTON, R. E. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*. 1998, vol. 67, s. 545-79.

WOO, C. H., LIM, J. H., KIM, J. H. VCAM-1 upregulation via PKCdelta-p38 kinase-linked cascade mediates the TNF-alpha-induced leukocyte adhesion and emigration in the lung airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005, vol. 288, no. 2, s. L307-16.

WU, Z., et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999, vol. 98, no. 1, s. 115-24.

YAMAMOTO, Y., GAYNOR, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest*. 2001, vol. 107, no. 2, s. 135-42.

YAMAMOTO, Y., GAYNOR, R. B. Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr Mol Med*. 2001, vol. 1, no. 3, s. 287-96.

YAMAMOTO, Y., et al. Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem*. 1999, vol. 274, no. 38, s. 27307-14.

YAN, S. D., et al. Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nat Med*. 1995, vol. 1, no. 7, s. 693-9.

YANG, F., et al. Increased nuclear factor-kappaB activation in colitis of interleukin-2-deficient mice. *J Lab Clin Med*. 1999, vol. 134, no. 4, s. 378-85.

YIN, M. J., YAMAMOTO, Y., GAYNOR, R. B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*. 1998, vol. 396, no. 6706, s. 77-80.

YOON, J. C., et al. Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. *Dev Cell*. 2003, vol. 5, no. 1, s. 73-83.

YOON, J. C., et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 2001, vol. 413, no. 6852, s. 131-8.

YOSHIDA, M. HTLV-1 oncoprotein Tax deregulates transcription of cellular genes through multiple mechanisms. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1995, vol. 121, no. 9-10, s. 521-8.

ZAKRZEWSKA, K. E., et al. Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance. *Diabetes*. 1997, vol. 46, no. 4, s. 717-9.

ZAMPETAKI, A., et al. Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF-kappaB signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005, vol. 288, no. 6, s. H2946-54.

ZHANG M, et al. Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase. *Circulation*. 2006, vol. 113, no. 9, s. 1235-43.

ZHANG, Y., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev*. 2004, vol. 18, no. 2, s. 157-69.

ZHOU, G., KUO, M. T. NF-kappaB-mediated induction of mdr1b expression by insulin in rat hepatoma cells. *J Biol Chem*. 1997, vol. 272, no. 24, s. 15174-83.

ZONG, H., et al AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, vol. 99, no. 25, s. 15983-7.

J. Seznam použitých zkratek

ADD-1/SREBP-1c	adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element-binding protein-1c
AGEs	advanced glycation end products
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP-1	activator protein-1
BSA	bovine serum albumin
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CaMK	calcium/calmodulin-dependent protein kinase
COX	cyclooxygenase
CBP	CREB binding protein
CREB	cAMP response element-binding protein
CynA	cyclophilin A
DM	diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EBV	Epstein-Barr virus
ELAM-1	endothelial leukocyte adhesion molecule
EMEM	Eagle's minimum essential medium
ER	estrogen receptor
ERRs	estrogen-related receptors
FasL	Fas ligand
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FFA	free fatty acid
FOXO1	forkhead box O1
FXR	farnesoid X receptor
GADPH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GLUT4	glucose transporter
GR	glucocorticoid receptor
GTFs	general transcription factors
HBV	hepatitis B virus
HCMV	human cytomegalovirus
HDL	high density lipoprotein
HepG2	human hepatoma cell line
HIV	human immunodeficiency virus

HNF4 α	hepatic nuclear factor-4- α
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HRP	horseradish peroxidase
HTLV	human T-cell leukemia virus
HSV	herpes simplex virus
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IAPs	inhibitor of apoptosis proteins
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IDDM	insulin-dependent diabetes mellitus
IF	interferon
I κ B	inhibitor of κ b
IKK	inhibitor of κ B kinase
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LBD	ligand-binding domain
LDL	low-density lipoprotein
LTR	long terminal repeat
LXR	liver X receptor
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant molecule-1
M-CSF	monocyte colony-stimulating factor
MDR	multi drug resistance
MEF-2c	myocyte enhancer factor-2c
MEK	MAP kinase kinase
MEKK1	MAPK/ERK kinase kinase 1
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
MR	mineralocorticoid receptor
NAC	N-acetyl-cystein
NAK	NF- κ B-activating kinase
NC	nitrocellulose
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NFT	neurofibrillary tangles
NIK	NF- κ B-inducing kinase
NRF	nuclear respiratory transcription factor

NSAIDs	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
PDGF	platelet derived growth factor
PDTC	pyrrolidinedithiocarbamate
PERC	PGC-1-related estrogen receptor coactivator
PGC	PPAR γ coactivator
PKA	protein kinase A
PKB/Akt	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PLA ₂	phospholipase A ₂
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	peroxisome proliferator response element
PRC	PGC-1-related coactivator
PTEC	proximal tubular epithelial cells
PVDF	polyvinylidene difluoride
PXR	pregnane X receptor
RANTES	regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
RHD	rel homology domain
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	real time-polymerase chain reaction
RXR	retinoid X receptor
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Sox9	sry-related HMG box-9
SRC	steroid receptor coactivator
SREBP-1	sterol regulatory element binding protein-1
TCR	T-cell receptor
TF	transcription factor
THR	thyroid hormone receptor
TNF	tumor necrosis factor
TRAF	TNF- α receptor associated factor
TRAIL	TNF- α related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL-receptor
UCP-1	uncoupling protein
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VSMC	vascular smooth muscle cells
WHO	World Health Organization

K. Seznam publikovaných prací

RYPKA, M., ČERVENKOVÁ, K., UHERKOVÁ, L., POCZATKOVÁ, H., BOGDANOVA, K., VESELÝ, J. Changes in mRNA levels of intracellular fatty acid metabolism regulators in human hepatoma HepG2 cells following their treatment with non-esterified fatty acids and dehydroepiandrosterone. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005, vol. 149, no. 2, s. 251-6.

BOGDANOVA, K., POCZATKOVA, H., UHERKOVA, L., RIEGEROVA, D., RYPKA, M., VESELY, J. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – a novel common aspect of the metabolic syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006, vol. 150, no. 1, s. 101-4.

POCZATKOVA*, H., BOGDANOVA*, K., UHERKOVA, L., CERVENKOVA, K., RIEGEROVA, D., RYPKA, M., VESELY, J. Dehydroepiandrosterone effects on the mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptors and their coactivators in human hepatoma HepG2 cells. *Gen Physiol Biophys.* 2007, vol. 26, no. 4, s. 268-74.

BOGDANOVA*, K., UHERKOVA*, L., POCZATKOVA, H., RYPKA, M., VESELY, J. mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptors and their coactivators are affected by glucose deprivation and oleate in human hepatoma HepG2 cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2007, vol. 151, no. 2, s. 237-45.

BOGDANOVA, K., UHERKOVA, L., POCZATKOVA, H., ČERVENKOVÁ, K., RYPKA, M., DOSTÁLOVÁ, K. Hormone dehydroepiandrosterone (DHEA) affects the cascade involving peroxisome proliferator-activator receptors and liver fatty-acid binding protein (L-FABP) in HepG2 cells. Zborník abstrakt – 16. Konferencia slovenských a českých patofyziológov 9.-10.06.2006. Univerzita Komenského.

POCZATKOVA, H., BOGDANOVA, K., DOSTÁLOVÁ, K., UHERKOVA, L., RYPKA, M., VESELÝ, J. An atypical response in HepG2 cells: the absence of a stimulatory effect of fatty acids on the level of mRNA of liver fatty acid-binding protein (L-FABP). Zborník abstrakt 16. Konferencia slovenských a českých patofyziológov 9.-10.6.2006. Univerzita Komenského.

POCZATKOVA, H., BOGDANOVA, K., UHERKOVA, L., ČERVENKOVÁ, K., RYPKA, M., RIEGEROVÁ, D., VESELÝ, J. Ovlivnění exprese izoforem PPAR a některých jimi řízených genů

v buňkách HEPG2 hormonem dehydroepiandrosteronem (DHEA). Sborník abstrakt XXIII. Konference České společnosti pro hypertenzi. Belgicko-české sympozium o hypertenzi. Galén. 2006.

VESELÝ, J., BOGDANOVÁ, K., DOSTÁLOVÁ, K., MAČÁKOVÁ, J., PO CZATKOVÁ, H., RIEGEROVÁ, D. Metabolic syndrome: What is the true gist of it? Zborník abstraktov 16. Konferencie slovenských a českých patofyziológov, 9.–10.6.2006, Martin, Slovenská republika. Univerzita Komenského.

PO CZATKOVÁ, H., BOGDANOVÁ, K., UHERKOVÁ, L., ČERVENKOVÁ, K., RYPKA, M., RIEGEROVÁ, D., VESELÝ, J. Ovlivnění článků kaskády PPAR dehydroepiandrosteronem na úrovni mRNA. XXIV. Konference České společnosti pro hypertenzi; XVI. Konference prac. Skupiny Kardiologie ČKS; XII. Konference pracovní skupiny Srdeční selhání 2007.

*Tito autoři se na publikaci podíleli stejným dílem