

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přírodovědecká fakulta

**REGULACE METABOLISMU CHOLESTEROLU
V JÁTRECH PRAŽSKÉHO HEREDITÁRNĚ
HYPERCHOLESTEROLEMICKÉHO (PHHC)
POTKANA**

Diplomová práce

Bc. Marie Heczková

2010

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Richard Petrásek, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Jan Kovář, CSc.

Heczková, M., 2010: Regulace metabolismu cholesterolu v játrech Pražského hereditárně hypercholesterolemického (PHHC) potkana [Regulation of cholesterol metabolism in the liver in Prague hereditary hypercholesterolemic (PHHC) rat, Mgr. Thesis, in Czech] – 69 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: The detailed mechanisms of hypercholesterolemia development were studied in Prague hereditary hypercholesterolemic (PHHC) rat – an experimental model of dietary cholesterol induced polygenic hypercholesterolemia. The VLDL production rate and aldehyde dehydrogenase 1a7 activity were determined and selected genes (*ApoE*, *ApoF*) were sequenced in PHHC rats.

Tato práce byla financována grantem IGA MZ ČR NR/9401-3.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 29. 4. 2010

.....

Marie Heczková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala oběma školitelům za možnost vypracovat vlastní vědeckou práci. Mé velké díky patří zejména RNDr. Janu Kovářovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, velkou trpělivost a příjemnou spolupráci v celém průběhu vypracovávání této práce.

Zvláštní poděkování patří Mgr. Martině Coufalíkové za pomoc při práci se zvířaty při pokusech a Ing. Miluši Zimolové za rady a pomoc s molekulárně-biologickou stránkou práce. Rovněž bych ráda poděkovala i zaměstnancům pracovišť LHE a LVA IKEM za vytvoření příjemné pracovní atmosféry a ochotu kdykoli a s čímkoli pomoci.

1	ÚVOD	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	Plazmatické lipidy	2
2.1.1	Cholesterol	2
2.1.2	Triacylglyceroly	3
2.1.3	Fosfolipidy	3
2.1.4	Mastné kyseliny	4
2.2	Lipoproteiny	5
2.2.1	Třídy lipoproteinů	5
2.2.2	Apolipoproteiny	6
2.2.3	Metabolismus lipoproteinů	9
2.2.4	Hyperlipoproteinémie	18
2.2.5	Lipoproteiny u potkana	19
2.3	Pražský hereditárně hypercholesterolemický (PHHC) potkan	20
2.3.1	Analýza genové exprese v játrech PHHC potkanů	22
2.3.2	Lipoproteinový profil PHHC potkanů	25
3	CÍLE PRACE	26
4	MATERIÁL A METODY	27
4.1	Materiál	27
4.1.1	Pokusná zvířata	27
4.1.2	Primery	27
4.2	Pokusy na zvířatech	29
4.2.1	Charakterizace nascentních VLDL po aplikaci tyloxapolu	30
4.2.2	Indukce aldehyddehydrogenasy 1a7 fenobarbitalem	31
4.2.3	Stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7 u zvířat na různých dietách	31

4.2.4	Potvrzení přítomnosti apolipoproteinu E ve VLDL u PHHC potkanů	32
4.2.5	Izolace gDNA	32
4.3	Metody	32
4.3.1	Stanovení cholesterolu a TG	32
4.3.2	Stanovení celkového proteinu	32
4.3.3	Stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7	33
4.3.4	Izolace VLDL ultracentrifugací	34
4.3.5	SDS-PAGE	35
4.3.6	Izolace genomové DNA	37
4.3.7	PCR (polymerasová řetězová reakce)	38
4.3.8	Agarosová elektroforéza	40
4.3.9	Extrakce DNA z gelu	42
4.3.10	Sekvenace	43
4.4	Statistické zpracování výsledků	46
4.4.1	Charakterizace nascentních VLDL	46
4.4.2	Aldehyddehydrogenasa 1a7	46
5	VÝSLEDKY	47
5.1	Apolipoprotein E	47
5.1.1	Sekvenace genu ApoE	47
5.1.2	Přítomnost apo E ve VLDL	48
5.2	Charakterizace nascentních VLDL	48
5.2.1	Koncentrace TG a cholesterolu v séru	48
5.2.2	Koncentrace TG a cholesterolu ve VLDL	50
5.3	Sekvenace genu ApoF	51
5.4	Stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7	53
5.4.1	Indukce aldehyddehydrogenasy 1a7 fenobarbitalem	53
5.4.2	Stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7 u potkanů na různých dietách	55
6	DISKUZE	56

6.1	Akumulace cholesterolem obohacených VLDL	56
6.2	Charakteristika vybraných genů	58
6.2.1	Stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7	58
6.2.2	Sekvence Apof	59
7	ZÁVĚR	61
8	POUŽITÁ LITERATURA	62
9	POUŽITÉ ZKRATKY	68

1 ÚVOD

Ateroskleróza a její rizikové faktory představují jeden z nejvýznamnějších zdravotních problémů západní civilizace. Ateroskleróza je definována jako kombinace změn arteriální intimy, která vyúsťuje v místní akumulaci lipidů, dalších komponent krve a fibrózní tkáň, provázenou současně změnami v medii cévní stěny (1). Rizikové faktory, které hrají důležitou roli při jejím vzniku a rozvoji, je možné dělit z několika hledisek, nejčastější je dělení na neovlivnitelné (věk, pohlaví, genetické faktory a rodinná anamnéza) a ovlivnitelné (hyperlipoproteinémie, kouření a arteriální hypertenze) (2).

Hyperlipoproteinémie (HLP) jsou metabolická onemocnění, která jsou charakterizována zvýšenou koncentrací lipidů a lipoproteinů v plazmě. Významná část HLP je primární, tedy geneticky podmíněná. Může se jednat o monogenní poruchy, ale většina primárních HLP je polygenního původu. Ne všechny geny podílející se na rozvoji polygenních hyperlipoproteinémií byly identifikovány a jednoznačně charakterizovány. Jednou z možností jak tyto geny identifikovat je analýza mechanismu patogeneze těchto onemocnění na experimentálních modelech.

Takovým modelem může být Pražský hereditárně hypercholesterolemický (PHHC) potkan. U těchto potkanů lze vyvolat hypercholesterolémii srovnatelnou s lidskou podáním samotného cholesterolu bez přídavku žlučových kyselin. K hypercholesterolémii navíc přispívají třídy lipoproteinů spojené s rozvojem aterosklerózy u lidí. PHHC potkani představují rovněž model polygenní hypercholesterolémie.

Patogeneze této hypercholesterolémie dosud není jednoznačně objasněna. Protože klasickými metodami studia metabolismu lipoproteinů se její příčinu nepodařilo odhalit, byla provedena analýza genové exprese v játrech těchto potkanů. Výsledkem byla identifikace několika kandidátních genů, které mohou mít vliv na vznik a rozvoj hypercholesterolémie. Detailní studium úlohy těchto genů spolu se studiem fenotypové odpovědi PHHC potkanů na cholesterolovou dietu by mohlo přispět k objasnění některých z mechanismů vedoucích ke vzniku HLP a rozvoji aterosklerózy.

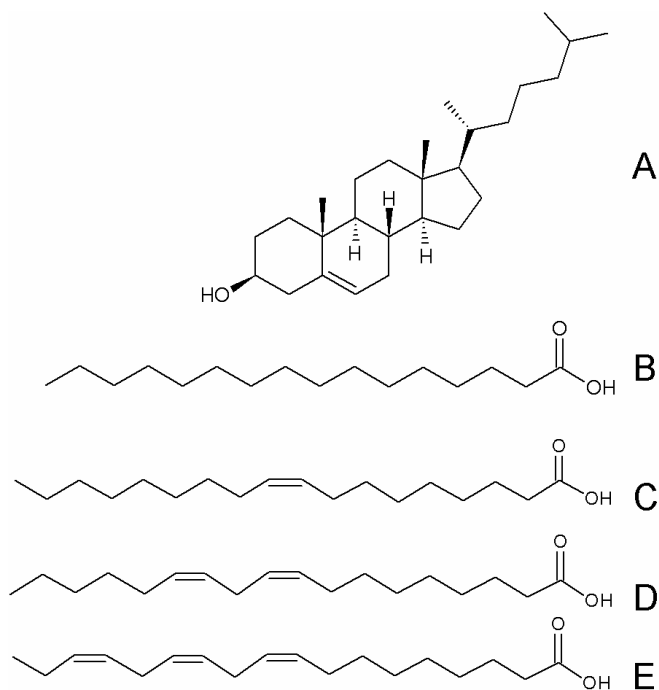
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 PLAZMATICKÉ LIPIDY

Lipidy jsou heterogenní skupina organických látek, jejichž společnou vlastností je rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech. V krvi se nacházejí cholesterol, triacylglyceroly, mastné kyseliny a fosfolipidy.

2.1.1 Cholesterol

Cholesterol je sterol živočišného původu, jehož struktura je odvozena od steranu. Molekula cholesterolu obsahuje ve své struktuře jednu dvojnou vazbu a v pozici 3 hydroxylovou skupinu – viz obr. 2.1. V těle se cholesterol vyskytuje buď volný (s neobsazenou –OH skupinou, proto částečně rozpustný ve vodném prostředí) nebo ve formě esteru s mastnou kyselinou (tedy zcela hydrofobní). Volný cholesterol je přítomen v buněčných membránách a v obalu lipoproteinových částic, esterifikovaný cholesterol pak v plasmě (kde je převážně esterifikován kyselinou linolovou a linolenovou) a uvnitř buněk, kde tvoří zásobní pool (zde je esterifikovaný převážně kyselinou olejovou a palmitovou) (3).



Obrázek 2.1 – Vzorce cholesterolu (A) a mastných kyselin palmitové (B), olejové (C), linolové (D) a linoleové (E)

Do organismu se cholesterol dostává buď potravou, nebo je syntetizován *de novo* z acetyl-CoA. Biosyntézy cholesterolu jsou schopny všechny jaderné buňky, většina cholesterolu je však syntetizována v hepatocytech (4). Syntéza cholesterolu může být rozdělena do pěti fází: 1. syntéza mevalonátu z acetyl-CoA, 2. tvorba isoprenových jednotek dekarboxylací mevalonátu, 3. kondenzace šesti isoprenových jednotek na skvalen, 4. cyklizace skvalenu za vzniku lanosterolu, 5. demethylace a redukce dvojných vazeb lanosterolu až na cholesterol.

Cholesterol je významnou součástí buněčných membrán a je prekurzorem řady látek, jako jsou steroidní hormony, vitamín D a žlučové kyseliny, které jsou nezbytné pro vstřebávání tuků a vitamínů rozpustných v tucích (A, D, E, K) (5). V buňkách je cholesterol esterifikován enzymem acylCoA : cholesterolacyltransferasou (6).

Z organismu je cholesterol vylučován žlučí buďto jako volný cholesterol nebo v podobě žlučových kyselin (kyselina cholová a chenodeoxycholová) (4). Ze žluči se část cholesterolu a žlučových kyselin reabsorbuje zpět do jater a může být znovu secernována do žluči v tzv. enterohepatálním oběhu (7).

2.1.2 Triacylglyceroly

Triacylglyceroly (triglyceridy, TG) jsou estery glycerolu a mastných kyselin, nejčastěji bývá na pozici C-1 kyselina palmitová, na C-2 se váže kyselina linolová a na C-3 pak kyselina olejová (viz obr. 2.1 a tabulka 2.1) (3).

Stejně jako cholesterol se TG dostávají do organismu potravou, nebo si je tělo syntetizuje (v játrech, tukových buňkách a tenkém střevě). V organismu mají TG význačnou funkci – přenášejí a hlavně uskladňují významný zdroj energie – mastné kyseliny (8).

2.1.3 Fosfolipidy

Jedná se lipidy obsažené převážně v membránách. Jsou syntetizovány všemi jadernými buňkami. Mají amfipatický charakter, záporně nabitý fosforečnanový ion (a případně další polární skupiny) je hydrofilní, tvoří řetězce mastných kyselin hydrofobní část (7). Většina fosfolipidů má strukturu odvozenou z diacylglycerolu, jedná se tedy o estery glycerolu s kyselinou fosforečnou. Ta je dále esterifikována dalšími sloučeninami (cholin, serin aj.). Zřejmě nejběžnějším z nich je fosfatidylcholin (dříve zvaný lecithin). K dalším fosfolipidům

patří např. sfingomyelin, ester sfingosinu, fosfátu a mastné kyseliny, který je obsažen v nervovém systému jak centrálním, tak periferním (v myelinových pochvách neuronů) (8).

2.1.4 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) se vyskytují v plazmě v podobě esterů i jako volné mastné kyseliny a jsou skladovány v zásobní formě v podobě TG v tukové tkáni (3). V případě potřeby jsou TG v tukových buňkách (adipocytech) hydrolyzovány hormon senzitivní lipasou a uvolněny do oběhu, kde jsou přenášeny zejména albuminem. Jejich osud se po vstupu do buněk odvíjí od typu buňky. Ve svalových buňkách jsou použity hlavně jako zdroj energie, v tukových buňkách jsou většinou esterifikovány a ukládány do kapének a v hepatocytech využity buď jako zdroj energie, nebo jsou secernovány ve formě lipoproteinů do cirkulace.

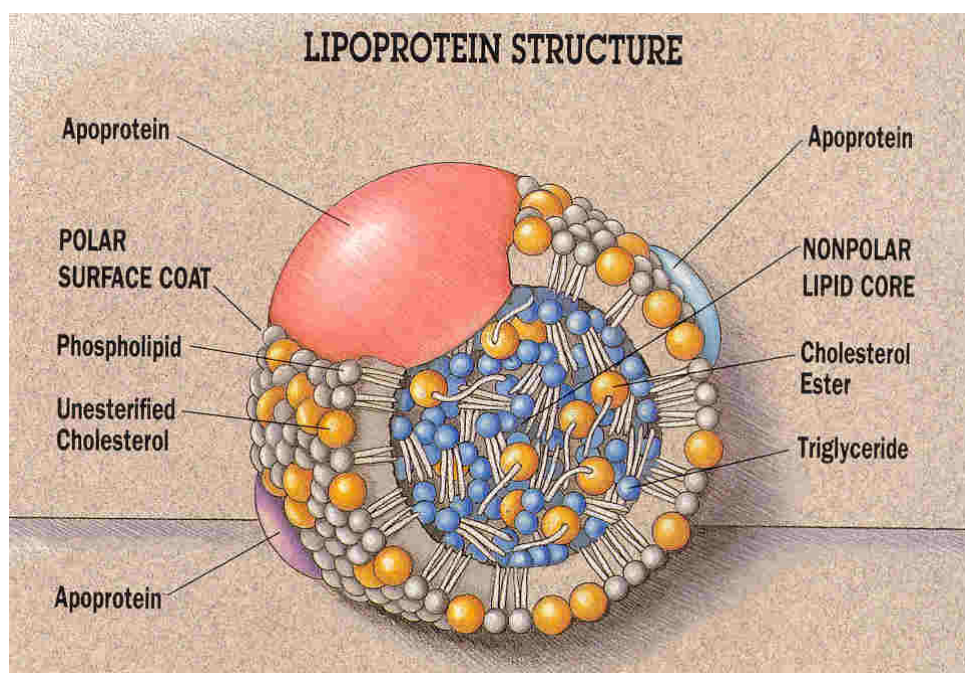
Mastné kyseliny lze dělit podle několika kritérií (9): podle délky řetězce, přítomnosti dvojných vazeb (nasyčené a nenasycené) nebo počtu a polohy dvojných vazeb. Nejrozšířenější mastné kyseliny jsou uvedeny v tabulce 2.1. Některé z těchto kyselin si tělo neumí vyrobit samo (jsou esenciální) a musí být přijímány v potravě. Vzorce mastných kyselin nejčastěji vázaných v esterech TG nebo cholesterolu jsou na obr. 2.1.

Tabulka 2.1: Nejrozšířenější MK. Vysvětlivky: C:D – tzv. lipidové číslo, udává poměr počtu uhlíků a dvojných vazeb, n-x – udává pozici poslední dvojně vazby v řetězci (počítáno od posledního methylovaného uhlíku), Δ^x – charakteristika dvojně vazby (poloha počítána od konce MK a konformace).

Název MK	C:D	n-x	Δ^x
myristová	14:0		
palmitová	16:0		
stearová	18:0		
olejová	18:1	n-9	cis, Δ^9
linolová	18:2	n-6	cis, cis- $\Delta^9\Delta^{12}$
linolenová	18:3	n-3	cis, cis, cis- $\Delta^9\Delta^{12}\Delta^{15}$
arachidonová	20:4	n-6	cis, cis, cis, cis- $\Delta^5\Delta^8\Delta^{11}\Delta^{14}$

2.2 LIPOPROTEINY

Protože plazmatické lipidy jsou nerozpustné ve vodném prostředí, musí být, s výjimkou volných mastných kyselin, na místo určené transportovány ve formě lipoproteinů (na obr. 2.2). Lipoproteiny jsou sférické částice složené z hydrofobního jádra obsahujícího esterifikovaný cholesterol a TG, které je obaleno jednoduchou vrstvou fosfolipidů (narozdíl od buněčných membrán, kde jsou fosfolipidy ve dvouvrstvě), neesterifikovaného cholesterolu a proteinů (apolipoproteinů), což umožňuje částici cestovat hydrofilním prostředím plazmy (3).



Obrázek 2.2: Struktura lipoproteinové částice. Převzato z: (10)

2.2.1 Třídy lipoproteinů

Lipoproteiny lze rozlišit podle několika hledisek. Historicky nejstarší dělení, které se dnes již nepoužívá, se odvíjí od jejich mobility při elektroforéze: na startu zůstávají chylomikrony, následuje frakce pre-beta, beta a nakonec frakce alfa lipoproteinů. Dnešní klasifikace lipoproteinů je založena na základě jejich izolace ultracentrifugací. Na tomto podkladě se rozlišuje pět hlavních tříd: chylomikrony, lipoproteiny o velmi nízké hustotě („very low density lipoproteins“, VLDL), lipoproteiny o střední hustotě („intermediate density lipoproteins“, IDL), lipoproteiny o nízké hustotě („low density lipoproteins“, LDL) a lipoproteiny o vysoké hustotě („high density lipoproteins“, HDL).

Tyto lipoproteiny se liší nejen svou velikostí a hustotou (viz tabulka 2.2), která je dána podílem triacylglycerolů a esterifikovaného cholesterolu v jejich nepolárním jádře, ale také

apolipoproteiny. Lipoproteiny těchto pěti základních tříd ale nejsou homogenní a mohou být dále děleny do několika podtříd, které jsou popsány v dalších kapitolách.

Tabulka 2.2: Přehled plazmatických lipoproteinů. Převzato z: (11).

	chylomikrony	VLDL	IDL	LDL	HDL
elfo	start	pre-β	pre-β	β	α
velikost (nm)	75 – 1200	30 – 80	25 – 35	18 – 25	5 – 12
hustota (g·cm ⁻³)	0,93	0,93 – 1,006	1,006 – 1,019	1,019 – 1,063	1,063 – 1,210
složky na povrchu lipoproteinů (mol %)					
cholesterol volný	35	43	38	42	22-23
fosfolipidy	63	55	60	58	72-75
apolipoproteiny	2	2	2	0,2	7
složení jádra lipoproteinů (mol %)					
estery cholesterolu	5	24	22	81	82-84
triacylglyceroly	95	76	78	19	16-18

2.2.2 Apolipoproteiny

Jak již bylo zmíněno, apolipoproteiny (apoproteiny, apo) tvoří bílkovinnou část lipoproteinových částic. V lipoproteinech plní několik funkcí (12):

- ❖ jsou strukturální složkou lipoproteinů, které částici stabilizují a zároveň přispívají k její rozpustnosti ve vodném prostředí,
- ❖ působí jako kofaktory enzymů účastnících se metabolismu lipoproteinů,
- ❖ zprostředkují vazbu lipoproteinových částic na buněčné receptory.

Apolipoproteiny jsou rozděleny do několika tříd, stručný přehled nejdůležitějších z nich je uveden v tabulce 2.3. Kromě těchto jsou známy apolipoproteiny D, F, G, H, J, L a M.

Tabulka 2.3: Přehled nejdůležitějších apolipoproteinů. CH – chylomikrony. Upraveno podle:(3).

Apolipoprotein	Místo syntézy	Molekulová hmotnost (Da)	Lipoproteiny
apo A-I	střevo, játra	28 000	HDL, CH
apo A-II	střevo, játra	17 000	HDL, CH
apo A-IV	Střevo	46 000	HDL, CH
apo B-48	Střevo	264 000	CH
apo B-100	Játra	550 000	VLDL, IDL, LDL
apo C-I	Játra	5 800	VLDL, IDL, LDL
apo C-II	Játra	9 100	CH, VLDL, IDL, HDL
apo C-III	Játra	8 750	CH, VLDL, IDL, HDL
apo E	játra, periferní tkáň	35 000	CH, VLDL, IDL, HDL

Apolipoproteiny lze podle struktury proteinu i genu rozdělit do 3 skupin (13):

- ❖ první skupina, zahrnující apolipoproteiny A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III a E, zahrnuje proteiny s vysokým podílem α -helixů s amfipatickým charakterem (jedna strana α -helixu je nepolární, zanořena v povrchu lipoproteinové částice, a druhá polární, obrácená do prostoru); tyto apolipoproteiny mohou být mezi jednotlivými lipoproteiny volně vyměňovány,
- ❖ druhá skupina apolipoproteinů, tvořená apolipoproteiny B-100 a B-48, ve své struktuře obsahuje také helixy, které ale netvoří hlavní část jejich struktury; tyto apolipoproteiny nemohou být volně vyměňovány mezi lipoproteiny
- ❖ ostatní apolipoproteiny se řadí do třetí skupiny, ale nemají jednotnou strukturu nebo funkční domény.

Apolipoproteiny třídy A

Mezi apolipoproteiny této třídy patří apo A-I, apo A-II, apo A-IV a apo A-V. Tyto proteiny jsou syntetizovány hepatocyty a enterocyty.

Apolipoproteiny A-I a A-II se vyskytují převážně na částicích HDL, kde tvoří asi 90 % všech proteinů. Apo A-I je hlavním apolipoproteinem HDL, kde působí jako aktivátor enzymu lecithin: cholesterolacyltransferasy (LCAT), a umožňuje tak esterifikaci cholesterolu nascentních HDL (14). Slouží jako ligand pro buněčné receptory a výrazně přispívá

k maturaci a metabolismu HDL částic (15, 16) a tedy i celému reverznímu transportu cholesterolu. Do cirkulace vstupuje jako tzv. „lipid-poor apo A-I“ a na nascentních HDL. Apo A-II je druhý nejvíce zastoupený apolipoprotein na HDL, ale nemusí se na nich vyskytovat vždy (tzv. A-I-HDL a A-I-A-II-HDL, (17, 18)).

Apo A-IV je syntetizován ve střevním epitelu (19). Je přítomný hlavně v chylomikronech a HDL, usnadňuje výměnu apolipoproteinu C-II mezi lipoproteiny (20), funguje jako antioxidant a zřejmě zprostředkovává signalizaci pocitu nasycení (21).

Apolipoprotein B

Apolipoprotein B se vyskytuje ve dvou formách, jako apo B-100 a apo B-48. Jedná se o dva produkty téhož genu. Oba apolipoproteiny jsou nezbytné pro syntézu („assembly“) lipoproteinů přenášejících TG v hepatocytech a enterocytech a vstupují s těmito lipoproteiny do cirkulace. Každá částice lipoproteinu nese jedinou molekulu apo B. (22).

Apo B-100 je syntetizován v játrech a je strukturním lipoproteinem VLDL, na kterých je secernován do oběhu. mRNA pro Apo B-100 se do proteinu překládá celá. Tento apolipoprotein se nachází ve VLDL, IDL a LDL. Slouží jako ligand pro LDL receptory.

Apo B-48 je syntetizován ve střevě a jeho mRNA obsahuje v pozici 6666 namísto cytidinu uridin. Tato záměna vzniká editací mRNA a způsobuje předčasné ukončení translace (23, 24). Vzniká tím protein, který má délku asi 48 % proti jaternímu apo B-100. Do cirkulace vstupuje na chylomikronech, je jejich strukturním apolipoproteinem.

Apolipoproteiny třídy C

Jsou známy tři proteiny spadající do této třídy: apo C-I, apo C-II a apo C-III. Vyskytují se v HDL a lipoproteinech obsahujících apo B. Role jednotlivých proteinů v metabolismu lipoproteinů je různá. Apo C-I je kofaktorem lecithin : cholesterolacyltransferasy (25), apo C-II je kofaktorem lipoproteinové lipasy (26) a apo C-III tuto lipasu inhibuje (27).

Apolipoprotein E

Apolipoprotein E se vyskytuje na lipoproteinech přenášejících TG a na některých částicích HDL a slouží jako ligand pro receptory.

Je to polymorfní protein, tři alely $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$ kódují tři isoformy E2, E3 a E4. Tím vzniká šest různých genotypů a fenotypů (28). V populaci se nejčastěji vyskytuje isoforma apo E3,

následována apo E4, nejméně zastoupenou isoformou je apo E2. Jednotlivé isoformy se od sebe liší aminokyselinami v pozicích 112 a 158, a tedy i nábojem v tomto místě. To má vliv na interakce mezi doménami proteinu nebo na vazbu na LDL receptor (29), jak je shrnuto v tabulce 2.4. Zatímco u isoform apo E3 a E4 není vazba na receptor ovlivněna, isoforma apo E2 má afinitu k LDL receptoru nižší. Isoforma apoE4 souvisí s urychleným s rozvojem degenerativních nervových onemocnění.

Tabulka 2.4: Vlastnosti isoform apo E a jejich hlavní rozdíly. Vysvětlivky: Cys – cystein, Arg – arginin, LDLR – LDL receptor, LP – lipoprotein, HPL – hyperlipoproteinémie. Převzato z: (29).

Izoforma	Složení aminokyselin		Funkční rozdíly		Asociace s nemocí
	112	158	afinita k LDLR	afinita k LP	
apo E2	Cys	Cys	Nízká	HDL	HPL typu III
apo E3	Cys	Arg	Vysoká	HDL	není známa
apo E4	Arg	Arg	Vysoká	VLDL, LDL	Alzheimerova nemoc

Minoritní apolipoproteiny

Tyto apolipoproteiny se vyskytují v plazmě ve velmi malých množstvích. Jedná se o apolipoproteiny A-V, D, F, G, H, J, L a M. Apolipoprotein F byl identifikován jako „lipid transfer inhibitor protein“ (LTIP) a jeho funkce v metabolismu lipoproteinů je zmíněna v dalších kapitolách. Tyto apolipoproteiny jsou obsaženy většinou na HDL.

2.2.3 Metabolismus lipoproteinů

Lipidy, které tělo přijalo potravou, jsou transportovány jinými lipoproteiny než ty, které se v těle již vyskytují, a proto se i metabolismus lipoproteinů dělí na několik metabolických drah: transport tuků přijatých potravou je označován jako exogenní cesta, transport lipidů syntetizovaných játry k periferním tkáním jako endogenní cesta a přenos cholesterolu z periferních tkání do jater jako reverzní transport cholesterolu. Tyto dráhy se ale do značné míry prolínají, lipoproteiny různých drah mohou být katabolizovány stejnými enzymy a soutěží o stejné receptory.

Receptory, enzymy a proteiny účastníci se metabolismu lipoproteinů

Receptory

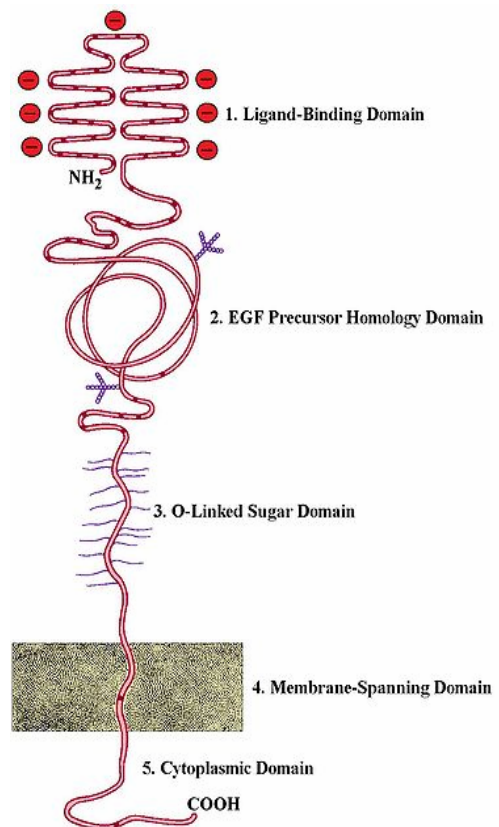
Receptory pro lipoproteiny hrají významnou úlohu v jejich metabolismu a představují důležitý prvek v udržení homeostázy lipidů. Regulují koncentraci cholesterolu v cirkulaci a umožňují doručení lipidů esenciálních pro správnou funkci buněk. Nejdůležitější roli v exo- a endogenní dráze metabolismu lipoproteinů hrají receptory z rodiny LDL-receptorů, v reverzním transportu jsou to pak scavengerové receptory a některé z ABC (ATP-binding cassette) transportérů.

Rodina LDL receptorů

Dnes je známo více než 10 proteinů z rodiny LDL receptorů. Tyto receptory umožňují vstup řady látek do buněk pomocí receptorem zprostředkované endocytózy. Jsou to vysoce homologní proteiny, které se skládají z následujících domén (30) (viz obr. 2.3):

1. ligand vázající doména (*N*-konec proteinu), specifická pro různé apolipoproteiny,
2. doména homologní k prekurzoru epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor, EGF),
3. doména *O*-vazebných oligosachardů,
4. transmembránová doména,
5. krátký cytoplazmatický úsek na *C*-konci peptidu.

Ne všechny proteiny této rodiny ale hrají úlohu v metabolismu lipidů, řada z nich se podílí i na transportu jiných makromolekul do buněk. Níže jsou stručně popsány receptory, které se metabolismu lipoproteinů účastní.



Obrázek 2.3: LDL receptor a jeho domény. Převzato z: (10)

LDL receptory (LDLR) jsou známy od roku 1979 (31) a jsou považovány za jakýsi prototyp proteinů této rodiny. Jejich ligandy jsou apo B-100 a apo E, proto jsou také nazývány apo B/apo E receptory. Jejich syntézy jsou schopny všechny jaderné buňky.

„LDL receptor-related proteins“ (LRP) byly objeveny v roce 1988 (32). Jsou exprimovány především na hepatocytech a slouží jako receptory pro chylomikronové remnanty (33). Jako ligand využívají apolipoprotein E.

VLDL receptory (VLDLR), objevené v roce 1992, využívají jako ligand rovněž apolipoprotein E. Jsou však exprimovány v buňkách extrahepatálních tkání (34).

Scavengerové (Acetyl-LDL) receptory

Jedná se o rodinu transmembránových proteinů, které váží široké spektrum ligandů. První scavengerové receptory (SR) byly objeveny koncem 70. let 20. století (35). Dnes se dělí do deseti tříd, z nichž osm (A – H) může hrát úlohu v rozvoji aterosklerózy (36). Scavengerové receptory se nacházejí hojně v játrech a makrofázích, ale i v hladké svalovině, endoteliálních buňkách a také v tkáních produkujících steroidní hormony, jako jsou nadledviny, varlata a vaječníky.

Mezi ligandy těchto receptorů patří mimo jiné i modifikované lipoproteiny, hlavně oxidované a acetylované LDL. Vychytávání těchto částic vede k přeměně makrofágů na pěnové buňky. Kromě toho některé SR rozpoznávají apoptické buňky, konečné produkty glykace (advanced glycation end-products, AGE), lipopolysacharidy nebo fragmenty buněčných stěn bakterií (37).

V metabolismu lipoproteinů hrají zásadní úlohu SR třídy A a třídy B (36, 38, 39).

Rodina scavengerových receptorů třídy A (SR-A) je tvořena pěti proteiny, které mají společnou strukturu (homotrimery s kolagenovými doménami). Nejdůležitějšími jsou SR-AI a SR-AII. Tyto proteiny jsou zakotveny v cytoplazmatické membráně a jsou hlavními SR pro modifikované LDL v makrofázích.

Receptory třídy B jsou proteiny, které dvakrát procházejí membránou a v extracelulární části tvoří velkou smyčku. Tato třída zahrnuje tři členy, které kromě modifikovaných lipoproteinů vážou i nativní lipoproteiny: CD36, umožňující vstup oxidovaných LDL do makrofágů, SR-BI a jeho sestřihovou variantu SR-BII, která se ale vyskytuje v menší míře.

Zřejmě nejvíce pozornosti je věnováno SR-BI. Kromě toho, že se podílí na vychytávání lipoproteinů obsahujících apo B, hraje významnou úlohu v metabolismu HDL a reverzním transportu cholesterolu. Tento protein, objevený v roce 1994 (40), se vyskytuje hlavně na makrofázích, endoteliálních buňkách a játrech a dalších steroidogenních buňkách, a slouží

jako receptor pro HDL částice (41). Podílí se na vychytávání lipoproteinů obsahujících apo B (42). Tyto proteiny rovněž zprostředkovávají tzv. selektivní příjem esterifikovaného cholesterolu do buněk (41, 42) a zvyšují účinnost obousměrného toku volného cholesterolu mezi HDL a buňkami (43).

ABC transportéry

Adenosintrifostát–vazebné kazety (ATP–binding cassettes, ABC) jsou členy velké rodiny proteinů rozdělených do 7 tříd (A – G), které slouží převážně jako transportéry (44). Tyto proteiny jsou složeny z transmembránové domény a domény cytoplazmatické, která je zodpovědná za navázání ATP. Funkční protein musí být dimer (45). Pomocí ABC transportérů je z buněk odstraňována celá řada látek lipofilní povahy, včetně cholesterolu. Spolupodílí se tedy na udržení homeostázy lipidů.

Nejčastěji zapojené ABC transportéry v metabolismu lipidů a lipoproteinů jsou z rodiny A a G, nejdůležitější jsou pak ABCA1, ABCG1, ABCG4 a ABCG5/G8 (46).

ABCA1 transportéry, které tvoří homodimery, jsou v organismu přítomny ve všech buňkách. Hrají důležitou roli v efluxu cholesterolu především v enterocytech, hepatocytech a makrofázích. Cholesterol, který se jimi uvolní z buněk, je přijímán hlavně apolipoproteinem A-I, tyto transportéry tedy přispívají k maturaci HDL částic (16).

ABC transportéry třídy G tvoří buď heterodimery nebo homodimery. ABCG1 a ABCG4 jsou rovněž spjaty s metabolismem HDL, cholesterol ale přenášejí na sférické formy HDL (47). Transportér ABCG5/G8 se nachází v enterocytech a jeho přispěním jsou steroidní lipidy (zejména sitosterol, ale i cholesterol) transportovány z enterocytů zpět do lumen střeva (48).

Enzymy

Lipoproteinová lipasa

Existence enzymu, který byl později nazván lipoproteinová lipasa (LPL) (49), byla prokázána už v roce 1943 (50). Tento enzym hraje zásadní úlohu při katabolismu lipoproteinů bohatých na TG, tedy chylomikronů a VLDL, v menší míře pak i IDL. Tato lipasa hydrolyzuje především triacylglyceroly. Je přítomna hlavně v tukové tkáni a příčně pruhovaném svalstvu, kde je navázána na heparansulfátech na endotelu kapilár (51). Působením LPL dochází k hydrolýze TG a uvolnění mastných kyselin z jádra lipoproteinů. Jejím kofaktorem je apolipoprotein C-II (26). Většina mastných kyselin uvolněná účinkem

LPL vstupuje do buněk. Lipoproteinová lipasa navázaná na chylomikronové remnanty je i ligandem pro LRP (52).

Jaterní lipasa

Jaterní lipasa (hepatic lipase, HL) je syntetizována v játrech, která jsou i hlavním místem jejího účinku (53). Hydrolyzuje jak triacylglyceroly, tak fosfolipidy. Katabolizuje zejména lipoproteiny přenášející TG, na rozdíl od LPL jsou jejím substrátem lipidy v lipoproteinech menší velikosti – tedy v IDL, LDL a HDL (53, 54). Stejně jako LPL plní i úlohu ligandu pro vazbu k receptorům a proteoglykanům (55).

Endoteliální lipasa

Endoteliální lipasa je exprimována endoteliálními buňkami a jedná se o enzym, u něhož převažuje fosfolipasová aktivita (56, 57). Tato lipasa hraje důležitou úlohu v katabolismu HDL, spolu s HL přispívá k jejich vychytávání v játrech a ledvinách (58, 59).

Lecithin : cholesterolacyltransferasa

Lecithin : cholesterolacyltransferasa (LCAT, popsána Glomsetem, 1962, (60)) je enzym, který se v cirkulaci vyskytuje v komplexech s HDL. Katalyzuje přenos mastné kyseliny z pozice 2 na lecithinu (fosfatidylcholinu) na 3- β -hydroxylovou skupinu cholesterolu. Esterifikace probíhá na částicích HDL, zdrojem cholesterolu a fosfolipidů jsou buněčné membrány a lipoproteiny. Aktivátorem enzymu je apolipoprotein A-I (14), dalším kofaktorem může být i apolipoprotein C-I (26).

Další proteiny v metabolismu lipoproteinů

„Cholesteryl ester transfer protein“

„Cholesteryl ester transfer protein“ (CETP) je protein, který zprostředkovává výměnu esterů cholesterolu mezi jednotlivými lipoproteiny (61, 62), konkrétně mezi HDL, VLDL a LDL. Je tedy dalším důležitým prvkem při reverzním transportu cholesterolu. O tom, zda je jeho efekt pro-, nebo antiaterogenní, rozhodují i hladiny celkového a HDL cholesterolu a koncentrace TG (63, 64).

„Lipid transfer inhibitor protein“

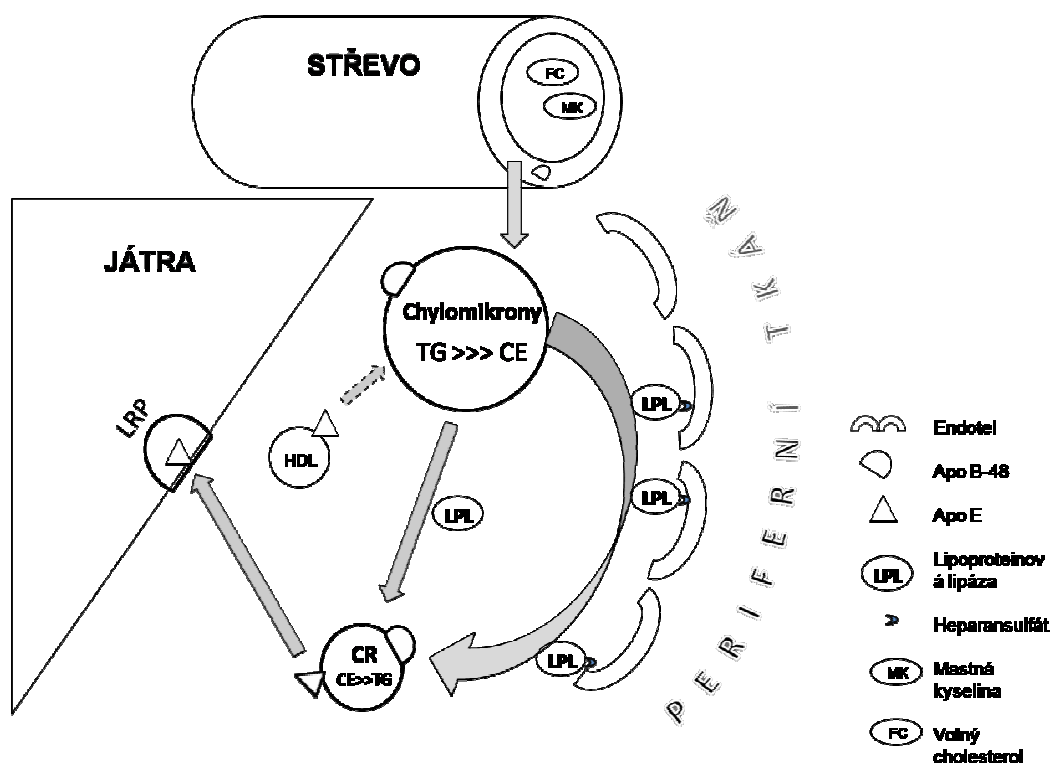
„Lipid transfer inhibitor protein“ (LTIP) je inhibitor výše zmíněného CETP. Je vázán na částice LDL (65). Později bylo zjištěno, že tento protein je identický s apolipoproteinem F (66).

„Phospholipid transfer protein“

„Phospholipid transfer protein“ (PLTP) přenáší hlavně fosfolipidy mezi HDL a VLDL (67). V plazmě se vyskytuje v aktivní a neaktivní formě (68). V interakci s dalšími faktory (receptory, enzymy i CETP), hraje významnou úlohu v metabolismu HDL (69).

Exogenní cesta

Exogenní cesta slouží k transportu lipidů přijatých potravou k periferním tkáním a do jater. Tuky v potravě jsou v lumen střev emulgovány žlučí a hydrolyzovány pankreatickou lipasou (7). Volný cholesterol, MK a monoacylglycerol vstupují do střevních buněk, kde jsou znovu re-esterifikovány, a v chylomikronech secernovány do lymfy (70). Tato cesta je schematicky znázorněna na obr. 2.5.



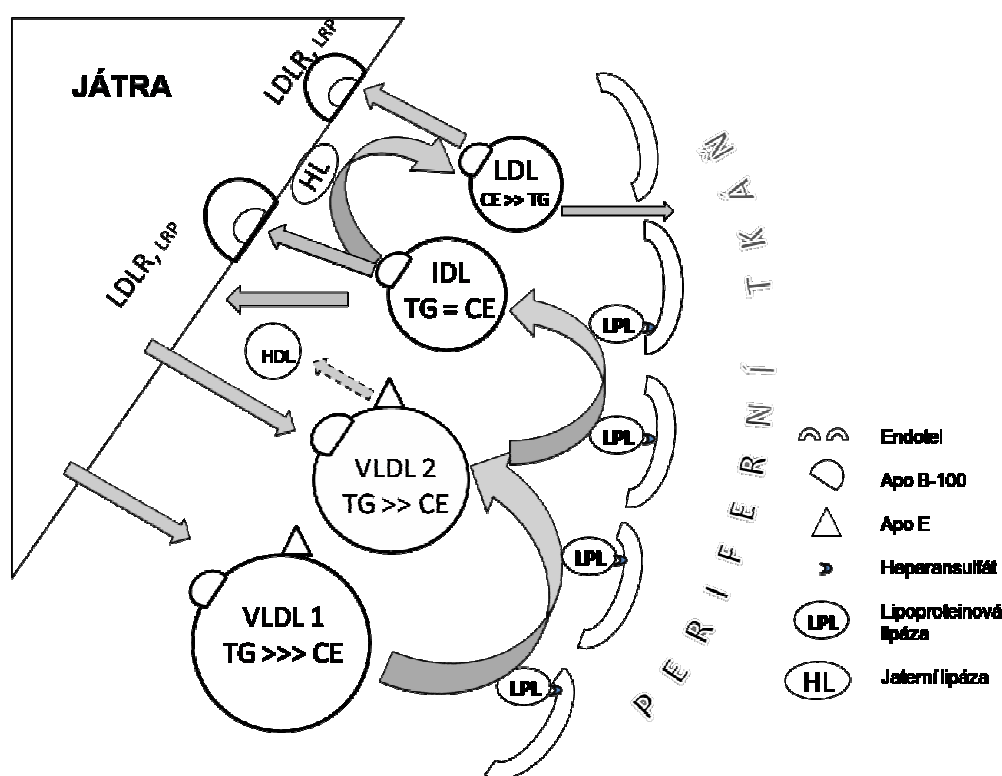
Obrázek 2.5: Schéma exogenní dráhy metabolismu lipoproteinů.

Chylomikrony se tvoří v enterocytech a obsahují až 90 % TG. Na svém povrchu nesou jednu molekulu apolipoproteinu B-48 (který je charakteristický pro tento typ lipoproteinů) a apolipoproteiny A-I, A-II a A-IV. Ze střeva putují chylomikrony lymfatickými cévami do *ductus thoracicus* a odtud do krve. V cirkulaci se obohacují o apolipoproteiny C-II, C-III a apoE, které pochází z HDL.

Působením LPL na cévním endotelu je hydrolyzována většina TG a z chylomikronů vzniknou částice označované jako chylomikronové remnanty. Jejich prostřednictvím se přenášejí estery cholesterolu ze střev do jater, kam remnanty vstupují endocytózou po navázání apo E na receptor chylomikronových remnantů, LRP. Na chylomikrony a jejich remnanty se nelze dívat jen jako na přenašeče dietních lipidů. Důležitá je i jejich role v transportu již vyloučeného cholesterolu ze žluče zpět do jater (71).

Endogenní cesta

Touto cestou jsou cholesterol a triacylglyceroly transportovány z jater k periferním tkáním ve formě VLDL, IDL a LDL. Tato dráha je schematicky znázorněna na obr. 2.6.



Obrázek 2.6: Schéma endogenní dráhy metabolismu lipoproteinů.

VLDL a IDL částice

Částice VLDL vznikají v játrech. Jejich hlavním úkolem je transport TG k buňkám v periferních tkáních. Při vstupu do cirkulace obsahuje jádro VLDL 65 % TG. Částice nesou jednu molekulu apo B-100 a apolipoproteiny C a E. Po vstupu do cirkulace jsou obohaceny o další apolipoproteiny pocházející z HDL. Jsou popsány dva typy VLDL částic: VLDL1 a VLDL2 (72). Syntéza VLDL probíhá v několika fázích: nejdříve vznikají pre-VLDL, které se do oběhu nedostávají, z nich pak VLDL2, které mohou být buď secernovány, nebo dále obohaceny lipidy za vzniku VLDL1 (73).

V cirkulaci jsou z VLDL lipoproteinovou lipasou odštěpovány mastné kyseliny, které ihned vstupují do buněk. Z VLDL částic tak vznikají částice IDL, které jsou dále metabolizovány v játrech. V jaterních sinusoidech mohou buď vstupovat do buněk přes LDLR nebo LRP, nebo jsou dále transformovány jaterní lipasou na částice LDL. Apolipoproteiny E a C se při zmenšování částice opět vrací na HDL.

LDL částice

Transport cholesterolu z jater k periferním tkáním zajišťují částice LDL, které vznikají při katabolismu VLDL. Jejich hlavním apolipoproteinem je apo B-100. Jsou obohacovány o další cholesterol, který získávají z HDL prostřednictvím CETP. Z cirkulace jsou odstraňovány hlavně LDL receptory (74), minoritní roli v clearance LDL částic hrají LRP.

Částice LDL tvoří heterogenní skupinu složenou z mnoha podtříd (75). Praktický význam má ale pouze dělení na „buoyant“ (velké) LDL a malé densní LDL („small dense LDL“, sdLDL). Na rozvoji aterosklerózy se významněji podílí sdLDL. Jejich vznik je spojen s vyšší koncentrací lipoproteinů transportujících TG v plazmě, což vede ke zvýšené výměně esterů cholesterolu a TG mezi VLDL a LDL.

Částicím sdLDL je připisován výrazný aterogenní potenciál hned z několika důvodů: mají sníženou afinitu k LDL receptorům (76) a zároveň snáze reagují s proteoglykany v cévní stěně (77), což je pravděpodobně následek jiné konformace apolipoproteinu B (78). Navíc jsou sdLDL náchylnější k oxidaci než normální LDL (79).

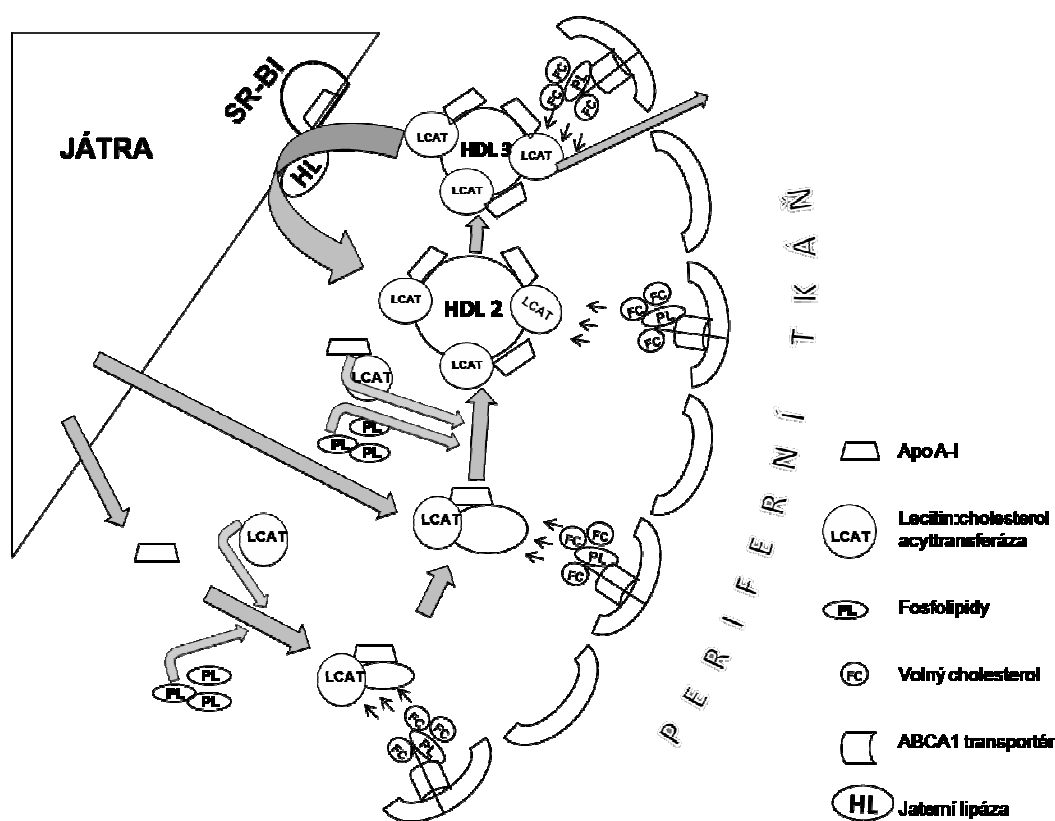
Vstup lipoproteinů do buněk

Lipoproteinové částice nebo jejich remnanty vstupují do buněk prostřednictvím receptoru (LDL-R, VLDL-R, LRP), v menší míře i nezávisle na nich. Při vstupu přes receptory je

lipoproteinová částice navázána na ligand-vážíci doménu receptoru a internalizována do endosomu. Ten fúzuje s lysozomem, v němž je lipoproteinová částice hydrolyzována. Částice LDL, které byly modifikovány (oxidované a acetylované LDL) vstupují zejména do makrofágů přes scavengerové receptory.

HDL částice a reverzní transport cholesterolu

Úlohou HDL částic je transport cholesterolu z periferie zpět do jater. Tento jev je nazýván reverzní transport cholesterolu a je znázorněn na obr. 2.7. V metabolismu HDL významně participují ABC transportéry (ABCA1, ABCG1/G4), LCAT a receptory SR-BI.



Obrázek 2.7: Reverzní transport cholesterolu

Biosyntéza HDL částic začíná v játrech, které secernují tzv. „lipid-poor apo A-I“. Ten se v cirkulaci okamžitě spojuje s volným cholesterolem a fosfolipidy za vzniku tzv. nascentních HDL, což jsou diskoidní částice složené z fosfolipidové dvouvrstvy a volného cholesterolu. Lipidy, potřebné k tvorbě nascentních HDL, pocházejí jak z buněk, tak z lipoproteinů. Nascentní HDL ale mohou vznikat už v játrech.

Nascentní HDL se spojují s LCAT, která esterifikuje jejich volný cholesterol. Tyto estery se hromadí uvnitř částice a HDL získávají sférický tvar. Tyto částice jsou označovány jako HDL₃. Další akumulací cholesterolu a fosfolipidů, pocházejících především z lipoproteinů a obohacením o další apolipoproteiny A-I a o apolipoproteiny C a E vzniká podtřída HDL₂. Tyto částice mohou být přeměněny znovu na HDL₃ působením CETP a jaterní lipasy, nebo mohou být vychytány receptory v játrech (LRP, SR-BI) nebo v jiných steroidogenních tkáních (SR-BI). Při vstupu do buněk po vazbě na receptory LRP dojde k degradaci částic v lysozomu, při navázání částic na SR-BI jsou estery cholesterolu buňkám odevzdány bez degradace lipoproteinové částice (tzv. selektivní příjem cholesterolu (80)).

2.2.4 Hyperlipoproteinémie

Hyperlipoproteinémie (HLP) představují skupinu metabolických onemocnění, která jsou charakterizována zvýšenou koncentrací lipidů a lipoproteinů v plazmě. Jsou důsledkem zvýšené tvorby nebo sníženého odbourávání lipoproteinů.

Hyperlipoproteinémie lze dělit podle několika hledisek a kritérií. Nejjednodušším (ale praktickým) dělením je klasifikace dle doporučení Evropské společnosti pro aterosklerózu z roku 1992, která HLP dělí do tří skupin:

- ❖ hypercholesterolemie – izolované zvýšení cholesterolu,
- ❖ kombinované (smíšené) hyperlipidémie – současné zvýšení cholesterolu a TG,
- ❖ hypertriglyceridémie – izolované zvýšení TG.

Dalším způsobem klasifikace HLP je genetická klasifikace. Ta se snaží respektovat etiopatogenezi poruchy. Podle ní se HLP dělí do dvou skupin:

- ❖ primární (familiární) – geneticky podmíněné poruchy,
- ❖ sekundární – vznikají jako důsledek jiného onemocnění, které ovlivňuje metabolismus lipidů a lipoproteinů.

Některé familiární hyperlipoproteinémie jsou uvedeny v tabulce 2.5. Primární HLP lze dále dělit na monogenní a polygenní. Monogenní poruchy, tedy poruchy způsobené mutací v jediném genu, se v populaci vyskytují s nízkou prevalencí, a nemají proto v epidemiologii HLP příliš velký význam. Většina primárních HLP je polygenní, na jejich vzniku se podílí mutace ve více genech. V těchto případech dochází často k interakci genetických predispozic a vnějšího prostředí (81, 82).

Tabulka 2.5: Příklady primárních hyperlipoproteinémií. Vysvětlivky: CH, TG – koncentrace cholesterolu /triacylglycerolů v séru, ¹u homozygotů jsou koncentrace cholesterolu i dvojnásobně až trojnásobně vyšší než u heterozygotů. Převzato z: (81, 82)

Typ hyperlipoproteinémie	Manifestace		Příčina
	CH	TG	
Monogenní poruchy:			
Familiární hypercholesterolemie	↑↑ - ↑↑↑ ¹	norma	porucha LDL-R
Familiární defekt apo B-100	↑↑ - ↑↑↑	norma	defekt apo B-100 (neváže se na LDL-R)
Familiární dysbetalipoproteinémie (HLP typ III)	↑↑	↑↑↑	varianta apo E (E2/E2), jiné
Deficience LPL (HLP typ I)	norma - ↑	↑↑↑↑	deficit LPL, deficit apo C-II
Polygenní poruchy:			
Familiární kombinovaná hyperlipidémie	↑↑	↑↑	zvýšená syntéza apo B-100 v játrech, jiné
Familiární triglyceridémie	norma	↑↑	varianty apo A-V, jiné
Polygenní hypercholesterolémie	?	↑↑	

2.2.5 Lipoproteiny u potkana

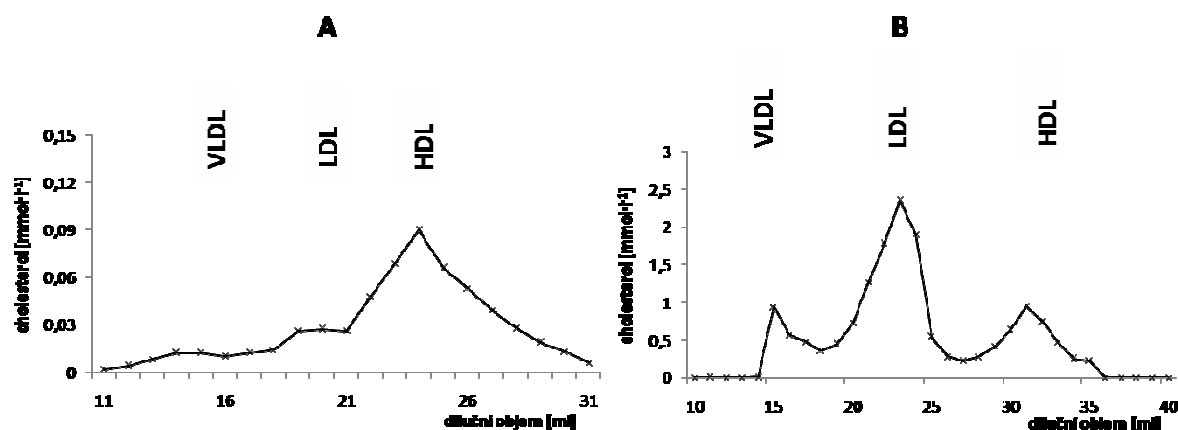
Potkan není obvykle používán při studiu patogeneze hypercholesterolémie, a to hned z několika důvodů, které jsou shrnuty v tabulce 2.6.

Tabulka 2.6: Rozdíly v metabolismu lipoproteinů mezi člověkem a potkanem.

	Potkan	Člověk
koncentrace cholesterolu v séru	< 2 mmol·l ⁻¹	~ 5 mmol·l ⁻¹
hlavní frakce LP přenášející cholesterol	HDL	LDL
přítomnost CETP	ne	ano
editace mRNA apo B-48	játra, střevo	játra

Zejména je to proto, že koncentrace cholesterolu v séru potkana dosahuje mnohem nižších hodnot než u průměrného člověka (u zdravého člověka by koncentrace cholesterolu v krvi neměla přesáhnout $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Důležitější však je, že potkani přenášejí až 3/4 svého cholesterolu v částicích HDL zatímco u člověka se většina cholesterolu nachází v LDL (až 2/3) – viz obr. 2.6. Potkan rovněž nemá CETP. To by snad mohlo vysvětlit mezidruhové rozdíly v distribuci cholesterolu, neboť i u lidí s deficiencí tohoto proteinu dochází k akumulaci cholesterolu v částicích HDL.

Po podání cholesterolu v dietě u potkanů dochází k rychlé přeměně cholesterolu na žlučové kyseliny. Proto je u nich těžké navodit hypercholesterolémii pouhým podáním cholesterolu. Tento problém se obvykle řeší podáním vysokých dávek kyseliny cholové, která zpětnovazebně inhibuje syntézu žlučových kyselin. Dochází tak nejen k akumulaci potravou přijatého cholesterolu, ale i k jeho snížené utilizaci játry pro tvorbu žlučových kyselin.



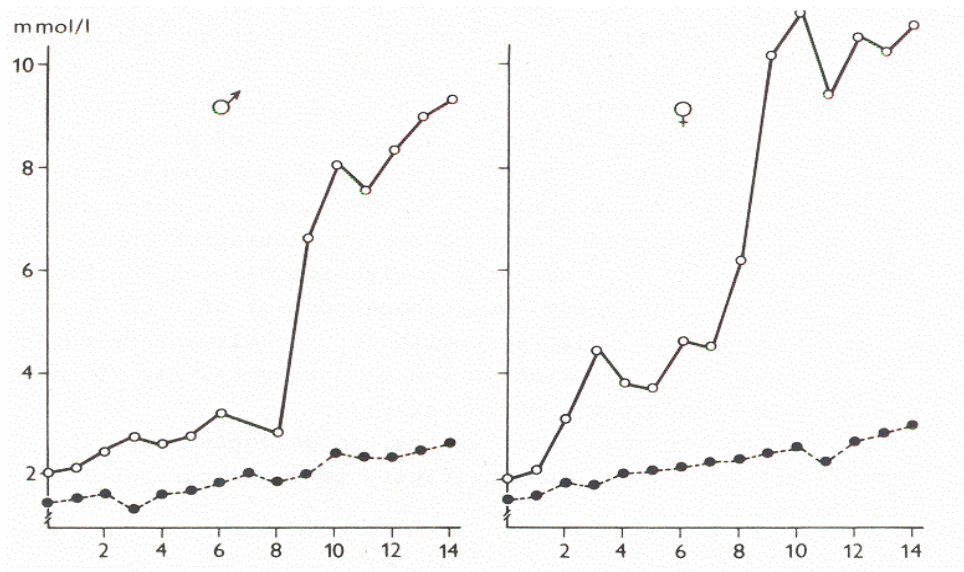
Obrázek 2.6: Distribuce cholesterolu v jednotlivých frakcích lipoproteinů u potkanů Wistar (A) a člověka (B). Převzato z: A- (83), B - (84).

2.3 PRAŽSKÝ HEREDITÁRNĚ HYPERCHOLESTEROLEMICKÝ (PHHC)

POTKAN

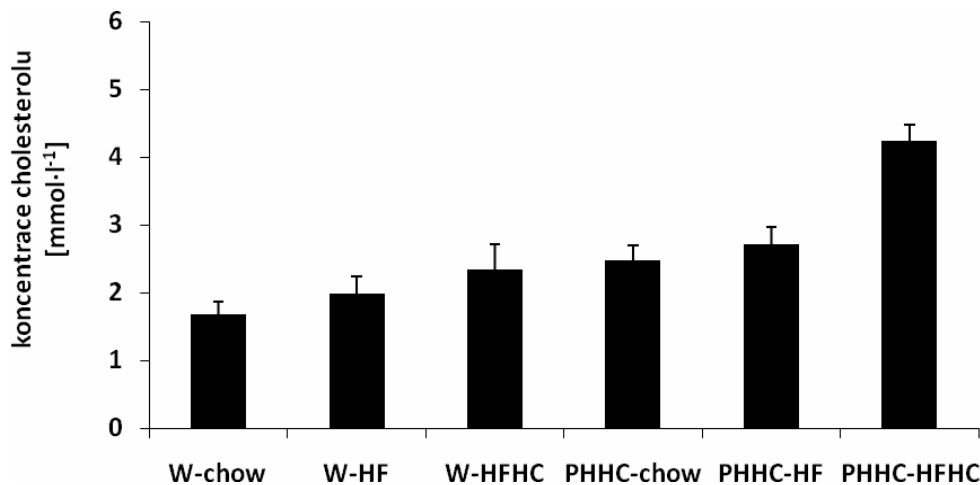
Vzhledem k výše uvedeným důvodům bylo učiněno několik pokusů o vyšlechtění potkanů, u kterých by bylo možné indukovat hypercholesterolémii dietním cholesterolem bez přídavku kyseliny cholové. V 80. letech se podařilo skupině prof. Poledneho v IKEM v Praze vyšlechtit kmen potkana, u něhož lze hypercholesterolémii navodit pouhým podáním cholesterolu rozpuštěného v tuku. Tento kmen byl nazván Pražský hereditárně hypercholesterolemický (PHHC) potkan (85).

Tito potkani byli vyšlechtěni z potkanů Wistar příbuzenským křížením jedinců, kteří byli nejcitlivější na podávaný cholesterol (2% cholesterol rozpuštěný v 5% loji, délka dietní intervence 2 týdny) – viz obr. 2.7. Do generace 3 cholesterolemie pozvolna narůstala, další generace vykazovaly téměř stabilní cholesterolemii a v generaci 8 u samců a 9 u samic došlo k prudkému nárůstu koncentrace cholesterolu po podání cholesterolové diety, která se ustálila mezi hodnotami 8 až 10 mmol·l⁻¹, pravděpodobně v důsledku rekombinace. Tato cholesterolemie se udržela i v dalších generacích (85).



Obrázek 2.7: Bazální (●) a dietním cholesterolem (○) indukovaná cholesterolemie u 14 generací potkanů v průběhu selekce PHHC potkanů z potkanů kmene Wistar. Převzato z: (85)

Potkani kmene PHHC mají v porovnání s Wistar potkany i na standardní dietě mírně zvýšenou cholesterolemii. Je-li potkanům podáván v potravě cholesterol, dojde k vzestupu koncentrace cholesterolu v séru i u Wistar potkanů, ale u PHHC potkanů je tento vzestup několikanásobný – viz obr. 2.7 a 2.8.



Obrázek 2.8: Cholesterolémie u PHHC a Wistar potkanů na různých dietách. Vysvětlivky: W – potkan Wistar, PHHC – PHHC potkan, chow – standardní dieta, HF – tuková dieta, HFHC – cholesterolová dieta. Převzato z: M. Zimolová, nepublikovaná data.

2.3.1 Analýza genové exprese v játrech PHHC potkanů

Patogeneze této dietou indukované hypercholesterolémie u PHHC potkana není objasněna, z dříve provedených pokusů ale vyplývá, že se jedná o polygenní hypercholesterolémii. Proto byl učiněn pokus, v němž byla provedena analýza transkriptomu v játrech potkanů PHHC i Wistar na čípech GeneChip® Rat Exon 1.0 ST Array. Expres byla stanovena u zvířat na standardní, tukové a cholesterolové dietě. Tuková dieta sloužila jako druhá kontrolní dieta a obsahovala 5% palmový olej přidaný ke standardní dietě, cholesterolová dieta obsahovala 1% cholesterol rozpuštěný v 5% palmovém oleji přidaný ke standardní dietě. Druhá kontrolní dieta byla použita pro eliminaci případného vlivu tuku, který je použit pro rozpuštění cholesterolu v dietě (není-li cholesterol při přípravě diety rozpuštěn v tuku, nevstřebá se). Ve studii byl použit palmový olej, který neobsahuje žádný cholesterol, ale zároveň je, přes svůj rostlinný původ, vysoce satureovaný a neměl by proto ovlivňovat genovou expresi tolik jako jiné tuky rostlinného původu obsahující polynenasycené MK.

Vliv diety na genovou expresi

Při analýze genové exprese v játrech bylo zjištěno, že palmový olej v tukové dietě neměl na expresi žádného z přibližně 6500 genů exprimovaných v játrech vliv.

Při použití kritéria nejméně 2násobné změny exprese na 5% hladině významnosti bylo u obou kmenů identifikováno několik genů, jejichž exprese byla u obou linií potkanů na cholesterolové dietě snížena ve srovnání s oběma dietami kontrolními – viz obr. 2.9. Jednalo se o osm genů, jejichž produkty jsou zapojeny v biosyntéze cholesterolu, produkty tří dalších genů (*Insig1*, *Pcsk9* a *Fads1*) hrají rovněž úlohu v metabolismu lipidů. Žádný z genů neměl u zvířat na cholesterolové dietě expresi zvýšenou.

Oba kmeny potkanů ale reagovaly na podání cholesterolu stejně. Proto byla položena otázka, zda se kmeny potkanů v jaterní expresi mezi sebou liší nezávisle na dietě.

Wistar Fold	Gene Symbol	PHHC Fold
cholesterol biosynthesis		
-2.9	<i>Acat2</i>	-3.9
-2.2	<i>Hmgcs1</i>	-3.5
-3.7	<i>Idi1</i>	-4.8
-2.6	<i>Fdft1</i>	-2.7
-8.8	<i>Sqle</i>	-13.6
-3.8	<i>Cyp51</i>	-4.3
-3.0	<i>Tm7sf2</i>	-3.7
-5.0	<i>Sc4mol</i>	-6.8
lipoprotein metabolism		
-4.6	<i>Insig1</i>	-3.0
-2.8	<i>Fads1</i>	-3.0
-2.1	<i>Pcsk9</i>	-2.5

Obrázek 2.9: Geny, jejichž exprese byla u zvířat na cholesterolové dietě alespoň 2násobně nižší než u zvířat na kontrolních dietách (na 5% hladině významnosti). Geny kódují tyto proteiny: *Acat2* – acetylCoA acetyltransferasa 2, *Hmgcs1* – 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA syntasa 1, *Idi1* – isopentyl-difosfát- Δ -isomerasa 1, *Fdft1* – farnesyldifosfát-farnesyltransferasa 1, *Sqle* – skvalenepoxidasa, *Cyp51* – sterol-14-demethylasa, *Tm7sf2* – Δ 14-sterolreduktasa, *Sc4mol* – sterol-C4-methyloxidase podobný protein, *Insig1* – inzulínem indukovaný gen 1, *Fads1* – desaturasa mastných kyselin 1, *Pcsk9* – proprotein konvertasa substilisin/kexin typ 9. Převzato z: M. Zimolová, nepublikovaná data.

Vliv kmene na genovou expresi

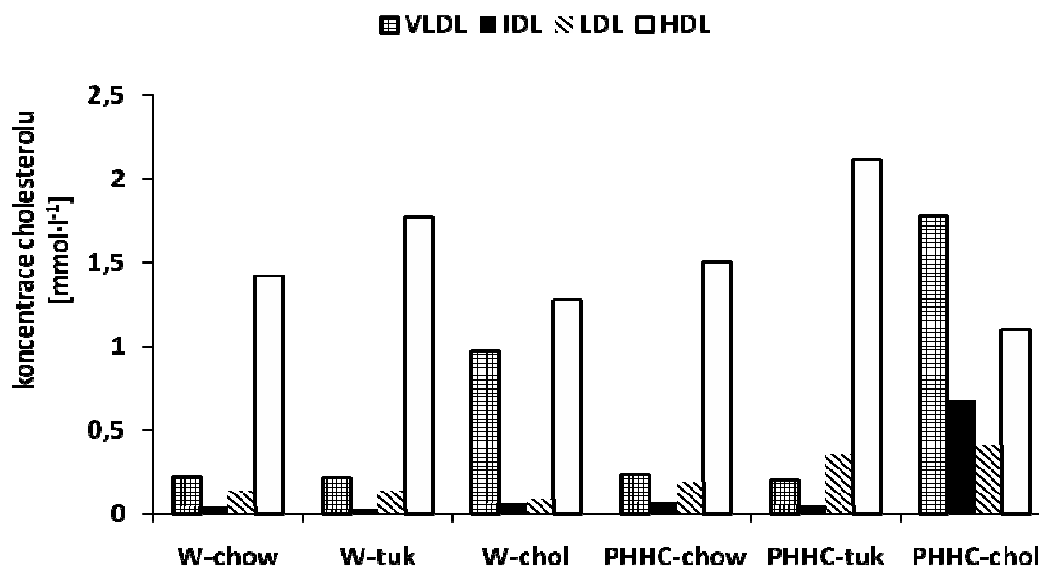
Při srovnání genové exprese mezi PHHC a Wistar potkany na stejných dietách bylo použitím stejného kritéria (2násobná změna exprese, $p < 0,05$) identifikováno několik genů, jejichž exprese se mezi kmeny lišila – viz obr. 2.10. U PHHC potkana bylo identifikováno 5 genů se sníženou expresí a 4 geny se zvýšenou expresí.

Apolipoprotein F

Jediným genem, jehož exprese byla u PHHC potkanů odlišná oproti potkanům Wistar a který má spojitost s metabolismem lipoproteinů, je gen kódující apolipoprotein F. Jak bylo uvedeno výše, tento apolipoprotein je znám jako „lipid transfer inhibitor protein“, který u člověka inhibuje „cholesteryl ester transfer protein“. Protože však CETP u potkanů není přítomen, je i úloha apo F u těchto zvířat neznámá.

2.3.2 Lipoproteinový profil PHHC potkanů

V rámci téhož pokusu byla analyzována distribuce cholesterolu v jednotlivých třídách lipoproteinů – viz obr. 2.11.



Obrázek 2.11: Distribuce cholesterolu v jednotlivých třídách lipoproteinů u PHHC a Wistar potkanů na různých dietách. Vysvětlivky: W – potkan Wistar, PHHC – PHHC potkan, chow – standardní dieta, tuk – tuková dieta, chol – cholesterolová dieta Přežvato z: (87).

Na standardní dietě nebyly mezi oběma kmeny potkanů nalezeny v distribuci lipidů žádné rozdíly. Na cholesterolové dietě stoupá u potkanů Wistar koncentrace cholesterolu ve VLDL, u PHHC potkanů výrazně vzrůstá VLDL-, IDL-, i LDL-cholesterol. Částice VLDL se u PHHC potkanů na cholesterolové dietě stávají dominantním přenašečem cholesterolu. Tyto částice jsou rovněž výrazně obohaceny cholesterolem – poměr VLDL-cholesterol/VLDL-TG je větší než 1. Jsou tedy velice podobné VLDL, se kterým se lze setkat u pacientů s familiární dysbetalipoproteinémií (hyperlipoproteinémií typu III).

3 CÍLE PRACE

Cíle této práce vycházejí z fenotypové odpovědi na cholesterolovou dietu i z analýzy genové exprese v játrech PHHC potkana:

1. Vysvětlit příčinu akumulace cholesterolem obohacených VLDL u PHHC potkanů na cholesterolové dietě:
 - a) sekvenací genu kódujícího apolipoprotein E a potvrzením přítomnosti tohoto proteinu ve VLDL,
 - b) zjištěním složení nascentních VLDL produkovaných játry.
2. Podrobněji charakterizovat dva vybrané geny, které jsou u PHHC potkanů odlišně exprimovány:
 - a) *Aldh1a7* – gen, jehož exprese byla u PHHC potkanů zvýšená nejvíce – na biochemické úrovni,
 - b) *ApoE* – jediný gen s odlišnou expresí u PHHC potkana, který může hrát úlohu v metabolismu lipoproteinů – na molekulárně-biologické úrovni.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 MATERIÁL

4.1.1 Pokusná zvířata

Potkani kmene PHHC byli z vlastního chovu IKEM. Potkani kmene Wistar, kteří sloužili jako kontrolní skupina, byli dodáni firmou AnLab (Praha, Česká republika). Ve všech pokusech byli použiti samci.

Všechna zvířata použitá při pokusech byla chována v označených plastických nádobách po 2 až 3 jedincích, za standardních podmínek (20°C, cyklus den:noc 12:12). Zvířata měla neomezený přístup k potravě i vodě.

Dieta

Potkani dostávali 3 různé diety:

- ❖ kontrolní dieta – dieta M2 (SEMED, Praha, Česká republika); (chow),
- ❖ tuková kontrolní dieta – M2 dieta s 5% palmovým olejem, sloužila jako druhá kontrolní dieta (HF),
- ❖ cholesterolová dieta – M2 dieta + 5% palmový olej + 1% cholesterol (HFHC).

4.1.2 Primery

Navrhla jsem primery pro:

- ❖ exony genu pro apolipoprotein E (*ApoE*, tabulka 4.1),
- ❖ exony genu pro apolipoprotein F (*ApoF*, tabulka 4.2),
- ❖ sekvenci odpovídající překládané oblasti genu *ApoF* (tabulka 4.3),
- ❖ krátký úsek ve 2. exonu *ApoF*, ve kterém byla u PHHC potkanů nalezena 17nukleotidová inserce (tabulka 4.4).

Pro navržení primerů byla použita sekvence z internetové databáze NCBI (88). Všechny primery jsem navrhla v programu Primer3, verze 0.4.0 (89). Kontrolu primerů pro gen apo E jsem provedla v programu BLAST (90), ostatní v programu BLAT (91).

Primery byly vyrobeny firmou Generi Biotech (Česká republika). Primery jsem rozpustila v deionizované vodě (ddH₂O) podle návodu výrobce na koncentraci 0,1 mmol·l⁻¹. Poté jsem jednotlivé dvojice primerů ke každému exonu naředila na pracovní koncentraci 0,01 mmol·l⁻¹ (primer mix). Naředěné primery byly uchovávány při -20 °C.

Tabulka 4.1: Primery použité pro PCR reakci a sekvenační reakci při sekvenování exonů genu *ApoE* získaných z genomové DNA. bp – páry bází.

Název	Vlákn	Sekvence (5' → 3')	Délka [nukleotidy]	Délka PCR produktu [bp]	Teplota nasednutí primerů [°C]
rApoE_1_L	3' > 5'	gcagggggagtcctataattg	21	288	60
rApoE_1_R	5' > 3'	atctctccatctgttctgacc	22		
rApoE_2_L	3' > 5'	gggggaggtaaatagaccttg	22	375	60
rApoE_2_R	5' > 3'	tttacctctgagcatcaatcc	22		
rApoE_3_L	3' > 5'	tgactccagacgcactgttg	21	327	60
rApoE_3_R	5' > 3'	taggtgccagataggaggaac	22		
rApoE_4(a)_L	3' > 5'	cttctcagcttctcaactctgg	24	699	64
rApoE_4(a)_R	5' > 3'	gcccaggcttgagtgac	18		
rApoE_4(b)_L	3' > 5'	gtatctgctgggtctgctctc	22	461	64
rApoE_4(b)_R	5' > 3'	aggcagaaacgataaactgagg	22		

Tabulka 4.2: Primery použité pro PCR reakci a sekvenační reakci při sekvenování exonů genu *ApoF* získaných z genomové DNA. bp – páry bází.

Název	Vlákn	Sekvence (5' → 3')	Délka [nukleotidy]	Délka PCR produktu [bp]	Teplota nasednutí primerů [°C]
ApoF_1_L	3' > 5'	gtcaacattgggcacctcatc	21	299	60
ApoF_1_R	5' > 3'	ggatatgggaaatgcaacacag	22		
ApoF_2(a)_L	3' > 5'	agggggttcctgactctg	20	850/867	60
ApoF_2(a)_R	5' > 3'	cccctcctcgatgataata	22		
ApoF_2(b)_L	3' > 5'	ctcaagagctccagaaaggtg	22	946	60
ApoF_2(b)_R	5' > 3'	cagctgattacccgaactgtg	22		

Tabulka 4.3: Primery použité pro PCR reakci a sekvenační reakci při sekvenování překládané oblasti genu *ApoF* získané z cDNA. bp – páry bází.

Název	Vlákn	Sekvence (5' → 3')	Délka [nukleotidy]	Délka PCR produktu [bp]	Teplota nasednutí primerů [°C]
cApoF_1U	3' > 5'	ggactatatgggtgctcagctcc	23	1087/1104	60
cApoF_2L	5' > 3'	ctgttcaggcgaagttggcc	22		

Tabulka 4.4: Primery použité pro PCR reakci a sekvenační reakci při sekvenování krátkého úseku ve 2. exonu *ApoF*. bp – páry bází.

Název	Vlákn	Sekvence (5' → 3')	Délka [nukleotidy]	Délka PCR produktu [bp]	Teplota nasednutí primerů [°C]
ApoF_insert_L	3' > 5'	gctgctttgctacctcctgc	20	82/99	60
ApoF_insert_R	5' > 3'	tgtgatcccaactgcgaggg	20		

4.2 POKUSY NA ZVÍRATECH

V rámci své diplomové práce jsem provedla nebo jsem participovala na následujících pokusech:

1. pokus, v němž byl PHHC a Wistar potkanům aplikován tyloxapol a následně byla stanovena koncentrace cholesterolu a TG ve VLDL izolovaných ultracentrifugací,
2. pokus, v němž jsme se u PHHC a Wistar potkanů pokusili indukovat tvorbu aldehyddehydrogenasy 1a7 podáním fenobarbitalu,
3. pokus, v němž byla sledována aktivita aldehyddehydrogenasy 1a7 u PHHC a Wistar potkanů,
4. pokus, jehož cílem bylo izolovat částice VLDL u PHHC a Wistar potkanů a zjistit, zda je u obou kmenů potkanů přítomen v těchto částicích apolipoprotein E.

V pokusech 1 a 3 byli potkani chováni na různých dietách (viz kap. 3.1.1). V pokusu 1 byly použity všechny 3 diety, v pokusu 3 byla použita standardní laboratorní dieta a cholesterolová dieta. V obou těchto pokusech trvala doba dietní intervence 3 týdny.

V pokusu 2 a 4, stejně jako při odběru krve z ocasní žíly pro izolaci gDNA, byla použita zvířata chována na standardní laboratorní dietě.

4.2.1 Charakterizace nascentních VLDL po aplikaci tyloxapolu

Nově vznikající VLDL se v organismu hromadí, pokud je inhibována lipoproteinová lipasa zodpovědná za jejich katabolismus. V tomto pokusu byl proto zvířatům aplikován Triton WR-1339 (tyloxapol) – inhibitor LPL – a analyzováno složení VLDL izolovaných ze séra 2 hodiny po jeho aplikaci. (92).

V experimentu bylo použito 18 PHHC potkanů a 18 potkanů Wistar. Jejich hmotnost se pohybovala v rozmezí 350 – 400 g. Potkani obou kmenů byli rozděleni do tří skupin, každá dostávala odlišný typ diety.

Po uplynutí doby dietní intervence byl potkanům aplikován nitrožilně tyloxapol. Pokus probíhal následovně:

- ❖ anestezie zvířete thiopentalem sodným (*i.p.* podání, 60mg/kg) a jeho zafixování v poloze na zádech,
- ❖ odběr krve z ocasní žíly do mikrozkušavky,
- ❖ zavedení katetru do *vena jugularis* a jeho zprůchodnění (fyziologickým roztokem),
- ❖ aplikace 1 ml 10% tyloxapolu ve fyziologickém roztoku katetrem,
- ❖ propláchnutí katetru fyziologickým roztokem a jeho vyjmutí.

Potkani byli poté ponecháni 2 hodiny v anestezii (za průběžné kontroly dýchání a anestezie). Po uplynutí této doby byla zvířata utracena cervikální dislokací a vykrvena.

Krev jsem ponechala 20 až 30 minut odstát, oddělila sraženinu od stěn zkumavek, centrifugovala 15 minut při 2 500 G a 4 °C (Allegra X-12R, Beckman Coulter) a odebrala sérum. Ve všech vzorcích séra byla stanovena koncentrace cholesterolu a TG, ze séra získaného po utracení zvířat byly izolovány VLDL ultracentrifugací (kap. 4.3.4).

Pokus byl rozložen do tří dnů, každý den byla utracena 2 zvířata od každého kmene na různých dietách (2 PHHC potkani a 2 potkani Wistar na chow dietě, 2 PHHC potkani a 2 potkani Wistar na tukové dietě, 2 PHHC potkani a 2 potkani Wistar na cholesterolové dietě). Pro izolaci VLDL byla spojena séra potkanů stejného kmene na stejné dietě v rámci téhož dne.

4.2.2 Indukce aldehyddehydrogenasy 1a7 fenobarbitalem

Pro validaci zaváděné metody na stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7 byl proveden pokus, v němž jsem využila jedné z charakteristických vlastností aldehyddehydrogenasy 1a7 – její indukovatelnost fenobarbitalem (86).

V tomto pokusu bylo použito celkem 12 potkanů Wistar a 10 PHHC potkanů o hmotnosti 294 – 422 g. Ti byli rozděleni do 2 skupin: polovina potkanů dostávala čistou pitnou vodu a polovina vodu s fenobarbitalem o koncentraci 1 mg/ml po dobu 1 týdne.

Na konci pokusu byli potkani utraceni cervikální dislokací a vykvrveni a byla jim odebrána játra. Hmotnosti potkanů a jejich jater byly zaznamenány. Část jater (~1,5 g) jsem ihned po odběru homogenizovala ve fosfátovém pufru (60mM Na₂HPO₄, pH = 8,5) v poměru 1:10 a izolovala cytosolickou frakci ultracentrifugací (L7-55 Beckman, rotor: SW 40 Ti, Beckman; 100 000 G, 1 hodina). Ze zkumavky jsem odstranila svrchní tukovou vrstvu a odebrala supernatant (cytosolickou frakci), ve kterém jsem následně stanovovala aktivitu aldehyddehydrogenasy 1a7 (viz kap. 4.3.3).

Inhibice aldehyddehydrogenasy Aldh 1a7 disulfiramem

Tento enzym je, na rozdíl od ostatních aldehyddehydrogenas, citlivý na inhibitor alkoholdehydrogenasy disulfiram (tetraethylthiuram disulfid) v koncentraci 50 μmol·l⁻¹ (86). V pokusu byly použity dva vzorky cytosolické frakce z každé skupiny potkanů z pokusu s indukcí enzymu fenobarbitalem, ve kterých jsem stanovovala aktivitu aldehyddehydrogenasy 1a7 v přítomnosti disulfiramu (viz kap. 4.3.3).

4.2.3 Stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7 u zvířat na různých dietách

Při pokusu bylo použito celkem 12 potkanů Wistar a 12 PHHC potkanů o hmotnosti 320 – 438 g. Šest potkanů Wistar a 6 PHHC potkanů bylo chováno na standardní laboratorní dietě, dalších 6 potkanů Wistar a 6 PHHC potkanů na cholesterolové dietě. Po skončení dietní intervence byli potkani utraceni cervikální dislokací, vykvrveni a byla jim odebrána játra. Část jater jsem zpracovala stejně jako v předešlé kapitole a po izolaci cytosolické frakce jsem v ní stanovovala aktivitu aldehyddehydrogenasy 1a7 (kap. 4.3.3.).

4.2.4 Potvrzení přítomnosti apolipoproteinu E ve VLDL u PHHC potkanů

Dva PHHC potkani a 2 potkani Wistar byli utraceni cervikální dislokací a vykrevni. Krev jsem ponechala odstát 20 až 30 minut při pokojové teplotě, poté oddělila sraženinu od stěn zkumavky a centrifugovala při 2 500 G a 4 °C (Allegra X-12R, Beckman Coulter). Ze séra byly izolovány VLDL ultracentrifugací (kap. 4.3.4). Protože u PHHC potkanů bylo pro ultracentrifugaci málo materiálu, byly oba vzorky séra sloučeny. Přítomnost apo E ve VLDL jsem zjišťovala pomocí SDS-PAGE (viz kap. 4.3.5).

4.2.5 Izolace gDNA

Krev pro izolaci gDNA (cca 0,5 ml) byla odebrána z ocasní žíly potkanů do zkumavek s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA) (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Rakousko) nebo jsem pracovala s krví získanou po utracení potkanů v předchozích pokusech.

4.3 METODY

4.3.1 Stanovení cholesterolu a TG

Koncentrace cholesterolu a TG v séru i jednotlivých frakcích získaných ultracentrifugací byla změřena v lipidové laboratoři (pracoviště IKEM) na autoanalyzátoru (Hitachi 902) komerčně dostupnými enzymatickými kity (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).

4.3.2 Stanovení celkového proteinu

Celkový protein byl stanoven podle Lowryho (93). Toto stanovení je založeno na chelataci měďného iontu imidovými strukturami v řetězci peptidu v alkalickém pH a následné redukci kyselin fosfomolybdenové a fosfowolframové ve Folin-Ciocalteauově činidle tyrozinovými zbytky proteinu.

Použité roztoky

- ❖ činidlo 1: 4% Na₂CO₃ v 0,2 M NaOH
- ❖ činidlo 2: roztok 0,04% vinan sodno-draselný a 0,02% CuSO₄ v činidle 1

❖ činidlo 3: Folin-Ciocalteuovo (Folinovo fenolové) činidlo ředěné ddH₂O v poměru 1:1

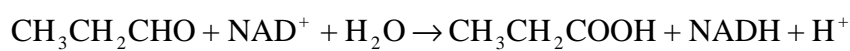
❖ roztok hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 0,1 mg.ml⁻¹

Jako standard byl použit roztok BSA ve fyziologickém roztoku. Koncentrace jednotlivých roztoků použitých pro sestavení kalibrační křivky byly: 0; 1,25; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 a 25 μg.ml⁻¹. Vzorek (supernatant získaný ultracentrifugací jaterního homogenátu) jsem ředila 400x. Vzorky i roztoky standardu byly ředěny ve fyziologickém roztoku.

K 0,5 ml vzorku nebo standardu jsem přidala 1 ml činidla 2 a nechala inkubovat 10 minut ve tmě. Poté jsem přidala 0,2 ml činidla 3 a inkubovala dalších 30 minut ve tmě. Koncentraci proteinu jsem stanovila spektrofotometricky při vlnové délce 752 nm.

4.3.3 Stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7

Aktivitu fenobarbitalem indukovatelné aldehyddehydrogenasy jsem stanovovala podle Dunna *et al.* (1989) s drobnými modifikacemi. Při přeměně substrátu (propanalu) se koenzym NAD⁺ redukuje na NADH. V reakční směsi probíhá reakce:



Použité roztoky

- ❖ pufr pro analýzu: 60mM fosfátový pufr (Na₂HPO₄, pH = 8,5), 1mM β-NAD⁺, 13,2mM propanal, 33μM pyrazol
- ❖ 30mM zásobní roztok disulfiramu v absolutním ethanolu
- ❖ absolutní ethanol

Stanovení jsem prováděla ve směsi obsahující 1,96 ml pufru a 40 μl vzorku (supernatantu získaného ultracentrifugací homogenátu jater).

Přírůstek NADH byl detekován spektrofotometricky při 340 nm (NanoDrop 2000c, ThermoScientific) při 37 °C v křemenných kyvetách.

Pufr jsem nechala temperovat 5 až 10 minut, poté jsem do kyvety přidala důkladně promíchaný vzorek, opatrně směs promíchala špičkou pipety a měřila dalších 10 až 15 minut.

Při stanovení aktivity enzymu v pokusu s indukcí enzymu fenobarbitalem jsem supernatant získaný z homogenizovaných jater PHHC potkanů pijících fenobarbital ředila 4x fosfátovým pufrům.

Při stanovení aktivity enzymu po inhibici disulfiramem jsem měřila aktivitu u jednoho vzorku ve třech různých reakčních směsích. Protože jsem disulfiram rozpouštěla v ethanolu, stanovovala jsem aktivitu enzymu s pufrům pro analýzu, s pufrům obsahujícím disulfiram ve výsledné koncentraci koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a s pufrům obsahujícím absolutní ethanol v množství odpovídajícím ředění zásobního roztoku disulfiramu.

Aktivitu enzymu jsem vyjádřila jako přírůstek koncentrace NADH v $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ za minutu na mg celkového proteinu. Pro výpočet jsem odečetala hodnoty mezi 2. a 8. minutou po přidání supernatantu k reakční směsi. Počáteční rychlost reakce jsem určovala extrapolací diferencí k nulovému času (94).

4.3.4 Izolace VLDL ultracentrifugací

Lipoproteiny lze separovat a izolovat ultracentrifugací (UC) (95). Při ní dochází k rozdělení jednotlivých lipoproteinů na základě hustoty. Pro izolaci VLDL se používá k úpravě hustoty fyziologický roztok. Výsledkem UC je rozdělení obsahu zkumavky na 2 frakce – horní („top“, T) a spodní („bottom“, B). Frakce T obsahuje požadované lipoproteiny, ve frakci B jsou ostatní lipoproteiny a proteiny.

Pro ultracentrifugaci byly použity ultracentrifugační zkumavky 13 x 65 mm (Ultra Clear, Beckman) a rotor typu 50.4 Ti (Beckman). Ultracentrifugaci jsem prováděla na ultracentrifuze L7-55 (Beckman).

Sérum o známém objemu jsem přenesla do ultracentrifugační zkumavky, na zkumavku upevnila víčko a doplnila fyziologickým roztokem. Zkumavku jsem zašroubovala a vložila do rotoru. Centrifugace probíhala 18 hodin při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $136\,000\text{ G}$. Po ukončení centrifugace jsem zkumavku rozřezala (přibližně 1,5 cm od horního okraje zkumavky) a kvantitativně odsála horní frakci, tedy VLDL (k vypláchnutí zbytků frakce ze zkumavky, víčka i nože jsem použila fyziologický roztok). Ve frakci obsahující VLDL byly stanoveny koncentrace cholesterolu a TG nebo byla použita pro průkaz apolipoproteinu E.

4.3.5 SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) je metoda, která slouží k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické mobility. Protože proteiny mají v přítomnosti SDS stejný náboj na jednotku hmotnosti, jejich mobilita je dána jejich molekulovou hmotností.

Použité roztoky

- ❖ SDS pufr pro elektroforézu: 0,025M Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris), 0,192M glycin, 0,1 % sodium dodecylsulfát (SDS)
- ❖ vzorkový pufr: 0,12M Tris (pH = 6,8), 3% SDS, 10% glycerol, 1,5% dithiotreitol, 1% merkaptooctová kyselina, 0,0025% bromfenolová modř
- ❖ barvicí roztok: 0,25% Coomassie blue – R250 ve směsi methanol : kyselina octová : voda v poměru 5 : 1 : 5
- ❖ odbarvovací roztok: směs methanol : kyselina octová : voda v poměru 5 : 1 : 5

Složení gelu a způsob nalévání

Pro SDS-PAGE jsem použila aparaturu Protean Mini Tetra Cell (Bio-Rad). Proteiny VLDL byly rozděleny v gradientu 3 – 20 % polyakrylamidu. Gel byl připraven z roztoků, jejichž složení je v tabulce 4.5.

Tabulka 4.5: Složení roztoků pro přípravu gradientového gelu (objem pro 1 gel).

gradientový separační gel	3%	20%
glycerol	61,25 mg	412,5 mg
TEMED	1 μ l	1 μ l
20% SDS	9,5 μ l	9,5 μ l
44% akrylamid	0,13 ml	0,85 ml
1,5 M Tris, pH = 9,1	0,24 ml	0,24 ml
ddH ₂ O	1,35 ml	0,413 ml
persíran amonný (100 g/l)	94 μ l	47 μ l

Tabulka 4.6: Složení startovního gelu (objem pro 2 gely)

startovní gel	
TEMED	4,5 μ l
20% SDS	15 μ l
30% akrylamid	0,3 ml
1 M Tris pH = 6,8	0,375 ml
ddH ₂ O	1,95 ml
persíran amonný (100 g/l)	0,3 μ l

Polymerizace byla zahájena přidáním roztoku persíranu, a roztoky byly ihned přeneseny do komůrek gradientového mixéru (SG 15/gradient maker, Hoefer). Směs byla pomocí peristaltické pumpy (EP-1 Econo Pump, Bio-Rad) nalita mezi složená skla (tloušťka gelu 0,75 mm) rychlostí 1,6 ml·min⁻¹. Gradientový separační gel jsem přelila převrstvovacím roztokem (~6% SDS v 2,5 M Tris, pH = 9,1) a nechala asi dvě hodiny polymerizovat. Poté jsem převrstvovací roztok slila a nanasla startovní gel připravený podle tabulky 4.6 a zasadila hřebínek. Po půl hodině jsem hřebínek vytáhla, skla vložila do elektroforetické aparatury a nanasla jsem vzorky a standard.

Příprava vzorků, aplikace

Delipidace VLDL

K VLDL jsem přidala 10násobek směsi ethanol-ether (3:1) a nechala stát přes noc při -20 °C. Poté jsem vzorky centrifugovala při -10°C a cca 100 G (Allegra X-12R, Beckman Coulter), odsála ethanol-ether, promyla cca 1,5 ml vychlazeného etheru a opět centrifugovala za stejných podmínek a ether odsála.

Příprava vzorků pro aplikaci

Proteiny získané delipidací VLDL jsem rozpustila ve vzorkovém pufru s redukčními činidly, odstranila zbytky éteru pod proudem dusíku a zkumavky na 3 minuty ponořila do vroucí vody. Do jamek jsem nanášela 15 µl vzorku nebo 5 µl standardu (Prestained SDS-PAGE Standards, Board Range, Bio-Rad), který jsem v jamce doplnila do 15 µl vzorkovým pufrem.

Podmínky elektroforézy a vizualizace

Elektroforéza probíhala v SDS pufru pro elektroforézu při konstantním proudu 12 mA cca 3 hodiny při 4°C. Po ukončení elektroforézy byl gel asi 12 hodin ponechán za stálého míchání v barvicím roztoku a dalších přibližně 16 hodin v odbarvovacím roztoku pro odbarvení pozadí.

Gely byly vyhodnocovány pomocí denzitometru GS-800 (Bio-Rad) a zpracovány v programu Quantity One (Bio-Rad).

4.3.6 Izolace genomové DNA

Izolaci genomových DNA (gDNA) pro sekvenaci genu *Apoe* a *Apof* jsem provedla z plné krve kitem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

Princip

Tento způsob izolace DNA je založen na principu adsorpce DNA na silikagelovou membránu a následné uvolnění DNA z membrány. DNA, uvolněná z buněk po jejich lýze, se po denaturaci ethanolem v přítomnosti chaotropních solí a nízkého pH váže svými polárními fosfátovými skupinami na Si–O–Si a Si–OH skupiny silikagelu. Z této vazby je DNA uvolněna roztokem s nízkou iontovou silou a vyšším pH.

Postup

Při izolaci gDNA jsem používala k lýze buněk proteasu K (aktivita 600 mAU·ml⁻¹) a lyzační pufr s guanidin hydrochloridem (stejná chaotropní sůl byla obsažena i v promývacím roztoku AW1). Přesný postup byl následující:

1. na dno 1,5ml mikrozkušavky jsem nanesla 20 µl proteasy K, přidala 200 µl plné krve a 200 µl lyzačního pufu AL (v tomto pořadí)
2. směs jsem důkladně 15 – 20 s promíchávala vortexem,
3. směs jsem inkubovala ve vodní lázni při teplotě 56 °C 10 minut,
4. přenesla jsem směs na kolonku (umístěnou ve 2ml sběrné zkumavce) a centrifugovala 1 minutu při 15 000 G; pokud kolonkou neprošel celý její obsah, centrifugaci jsem opakovala,
5. obsah sběrné zkumavky jsem slila, na kolonku jsem nanesla 500 µl roztoku AW1 a centrifugovala 1 minutu při 15 000 G; pokud v kolonce stále zůstávaly stopy po původním materiálu, promytí AW1 roztokem jsem opakovala,
6. obsah sběrné zkumavky jsem slila, na kolonku jsem nanesla 500 µl AW2 roztoku a centrifugovala 1 minutu při 15 000 G,
7. obsah sběrné zkumavky jsem slila a kolonku vysušila centrifugací 2 minuty při 17 000 G,

8. kolonku jsem přenesla do čisté 1,5ml mikrozkušavky, na kolonku jsem nanesla 100 μ l AE pufru a po minutové inkubaci jsem kolonku centrifugovala 2 minuty při 17 000 G.

Měření koncentrace DNA

Koncentraci izolované gDNA jsem stanovovala spektrofotometricky. DNA absorbuje záření o vlnové délce 260 nm. Na základě změřené absorbance při této vlnové délce lze vypočítat koncentraci DNA ve vzorku. Současně lze stanovit i hodnotu absorbance při vlnové délce 280 nm (vlnová délka, při níž dochází k maximální absorpci záření proteiny) a poměrem absorbancí A_{260}/A_{280} vyjádřit čistotu izolované DNA (u čisté DNA by měl být poměr 1,8; při vyšší hodnotě je vzorek znečištěn fenolem, při nižší proteiny).

Koncentraci izolované gDNA jsem měřila na NanoDropu 2000 (Thermo Scientific) proti AE pufru. Získaná gDNA byla uchovávána při teplotě 2 – 8 °C v lednici.

4.3.7 PCR (polymerasová řetězová reakce)

Princip

Polymerasová řetězová reakce (PCR) je metoda umožňující amplifikaci určitého úseku DNA. Využívá se vlastnosti enzymu polymerasy připojovat deoxynukleotidy (dNTPs) ke krátkému úseku DNA (primeru a nově vznikajícímu vlákně) podle komplementárního vlákna DNA (templátu).

PCR sestává z opakujících se cyklů, které jsou tvořeny těmito kroky:

- ❖ denaturace – dojde k oddělení dvou vláken DNA od sebe, aby primery mohly v dalším kroku nasednout na vlákno DNA; dochází k ní při teplotě kolem 95 °C a trvá 20 až 30 vteřin,
- ❖ připojení primerů – teplota se sníží na 50 až 70 °C, což umožní nasednutí primerů na specifická místa; trvá cca 30 vteřin,
- ❖ elongace – připojování dNTP k primeru a nově vznikajícímu komplementárnímu vlákně, při teplotě optimální pro činnost polymerasy (~75 °C); trvá podle délky produktu 30 až 60 vteřin.

Opakování těchto cyklů umožňuje až 10^6 násobného pomnožení vybraného úseku nukleových kyselin. Polymerasa použitá při PCR musí být termostabilní a ke správné funkci vyžaduje v reakční směsi Mg^{2+} ionty.

Použité roztoky

- ❖ PCR pufr – zásobní roztok 10x konc., 500mM Tris-HCl (pH = 9,1), 160mM $(NH_4)_2SO_4$, 25mM $MgCl_2$, BSA (1,5 $mg \cdot ml^{-1}$); sterilní,
- ❖ deoxynukleotidy (Fermentas) – zásobní roztok o koncentraci 2 $mmol \cdot l^{-1}$ pro každý dNTP,
- ❖ polymerasa (Fermentas) – aktivita 5 $U \cdot \mu l^{-1}$,
- ❖ primery – mix pravého a levého primeru ke každému produktu o koncentraci 0,01 $mmol \cdot l^{-1}$.

Postup

PCR pobíhala v termocykléru od firmy Bio-Rad. Použité primery jsou uvedeny v tabulkách 4.1 až 4.4 v kap. 4.1.3.

Pro všechny sekvenované exony jsem provedla dva typy PCR. První sloužila k optimalizaci PCR a jejím účelem bylo nalézt správnou teplotu připojení primerů. Tyto PCR jsem provedla v objemu 25 μl . Druhý typ PCR sloužil k namnožení produktů (exonů) před jejich extrakcí a sekvenací a její objem byl 50 μl . Objemy pipetované pro jednotlivé typy PCR jsou uvedeny v tabulce č. 4.7 a programy použité pro PCR jsou uvedeny v tabulce 4.8.

Tabulka 4.7: Složení směsi pro PCR. Pipetované objemy jsou v μl .

	25 μl	50 μl	Výsledná koncentrace
ddH ₂ O	16,9	33,8	
Pufr pro PCR	2,5	5	1 x konc.
dNTPs	2,5	5	0,2 $mmol \cdot l^{-1}$
Polymerasa	0,1	0,2	20 $mU \cdot \mu l^{-1}$
Primer mix	1	2	0,4 $pmol \cdot \mu l^{-1}$
gDNA	2	4	~ 1,5 $ng \cdot \mu l^{-1}$

Tabulka 4.8: Programy používané pro PCR jednotlivých exonů genů *ApoE* a *ApoF*. T – teplota.

krok cyklu		PCR produkty <i>ApoE</i>					PCR produkty <i>ApoF</i>						
		1	2	3	4a	4b	1	2a	2b	inzert	1U+2L		
denaturace	T	95 °C					95 °C						
	čas	2 min					2 min						
denaturace	T	95 °C					95 °C						
	čas	20 s					20 s						
nasednutí primerů	T	60 °C	60 °C	60 °C	64 °C	64 °C	38x	60 °C	60 °C	60 °C	60 °C	64 °C	38x
	čas	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s		30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	
elongace	T	71 °C					71 °C						
	čas	40 s					40 s	40 s	40 s	25 s	40 s		
terminační elongace	T	71 °C					71 °C						
	čas	3 min					3 min						
ochlazení	T	10 °C					10 °C						
	čas	10 s					10 s						

4.3.8 Agarosová elektroforéza

Agarosová elektroforéza je metoda sloužící k identifikaci a separaci molekul DNA nebo RNA podle jejich pohyblivosti v elektrickém poli. Protože vlákna nukleových kyselin mají negativní náboj, v elektrickém poli putují k anodě. Kratší fragmenty putují gelem rychleji a dále než fragmenty delší. Vizualizace se nejčastěji provádí pomocí interkalačního činidla ethidium bromidu (EtBr), který po ozáření světlem z UV oblasti emituje oranžové světlo.

Použité roztoky

- ❖ 50x TAE pufr: 2M Tris, 1M kyselina octová, 50mM EDTA, pH = 7,6 – 7,8; před použitím ředěno 100x na koncentraci 0,5x.
- ❖ 10x TBE pufr: 0,89M Tris, 0,89M kyselina boritá, 20mM EDTA, pH = 8,3; před použitím ředěno 20x na koncentraci 0,5x.
- ❖ vzorkovací pufr pro agarosovou elektroforézu: 1% bromfenolová modř nebo 6% dextranová modř, 7,5% glycerol, 1,2% 0,5M EDTA

❖ ethidium bromid (EtBr)

Vizualizace produktů PCR

Pro kontrolu PCR při její optimalizaci i pro kontrolu produktů před jejich extrakcí jsem použila agarosové gely různých hustot – rozpis navážek a objemů pro jejich tvorbu je uveden v tabulce 4.9.

Tabulka 4.9: Složení gelů a podmínky elektroforézy.

	Agarosový gel v TBE pufru			Agarosový gel v TAE pufru	
velikost PCR produktu	200 – 1500 bp	200 – 1500 bp	<150 bp	všechny	
hustota gelu	1,5%	1,5%	3%	1%	1%
objem gelu	20 ml	50 ml	50 ml	20 ml	80 ml
množství agarózy	0,3 g	0,75 g	1,5 g	0,2 g	0,8 g
množství pufru	20 ml	50 ml	50 ml	20 ml	80 ml
objem EtBr	1 µl	2,5 µl	2,5 µl	1 µl	4 µl
napětí	150 V			90 V	
doba elektroforézy	15 – 20 min	25 - 30 min	35 – 45 min	20 – 30 min	35 – 45 min

Agarosu v příslušném objemu pufru jsem rozvařila v mikrovlnné troubě za občasného, ale důkladného promíchání, dokud nebyl roztok zcela čirý. Do tekutého gelu jsem přidala EtBr a gel jsem nalila do připravené aparatury pro agarosovou elektroforézu (Green Range, Scie-Plas), zasadila hřeben a nechala ztuhnout. Z tuhého gelu jsem vytáhla hřeben, gel jsem zalila 0,5x TBE puftrem a nanášela jsem vzorky a standard.

Ke vzorkům jsem před nanesením do jamek přidala vzorkovací pufr s bromfenolovou modří v množství 10 % objemu reakce. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 150 V v 0,5x TBE pufru 15 – 45 minut (podle objemu a hustoty gelu, viz tab. 4.9). Produkty jsem srovnávala se 100 nebo 50 bp standardem (Fermentas). Po ukončení elektroforézy jsem produkty vizualizovala na elektronickém transluminátoru (Ultralum Inc.).

Přečištění produktů PCR

Pro přečištění produktů PCR jsem použila 1% agarosový gel v 0,5x TAE pufru. Rozpis navážek a objemů pro TAE gely jsou uvedeny v tabulce 4.9. Ke vzorkům jsem před

nanesením do jamek přidala vzorkovací pufr s dextranovou modří v množství 10 % objemu reakce. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 90 V 20 – 45 minut v 0,5x TAE pufru.

Po ukončení elektroforézy jsem produkty vizualizovala na elektronickém transluminátoru (Ultralum Inc.), vyřízla a přenesla do čistých 1,5ml mikrozkuvek a poté jsem z nich extrahovala DNA.

4.3.9 Extrakce DNA z gelu

Princip extrakce DNA z gelu je stejný jako při její izolaci (kap. 4.3.6).

Extrakce jsem provedla kitem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Ten obsahoval jako chaotropní sůl guanidin thiokyanatan (v QG pufru).

DNA z vyříznutých proužků gelu jsem extrahovala kitem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) podle návodu výrobce s mírnými modifikacemi:

1. k vyříznutému proužku gelu jsem přidala QG pufr v množství odpovídajícím 3násobku hmotnosti gelu (např. 100 mg gelu + 300 μ l QG pufru),
2. mikrozkuvku s gelem a pufrem jsem umístila do 50°C vodní lázně a gel jsem 10 minut rozpouštěla,
3. pokud byly produkty kratší než 500 bp, přidala jsem isopropanol v množství odpovídajícím hmotnosti gelu (např. 100 mg gelu + 100 μ l isopropanolu),
4. směs v mikrozkuvce jsem důkladně promíchala vortexem,
5. směs jsem přenesla na kolonky v čistých 2ml sběrných zkumavkách a centrifugovala 1 minutu při 13 000 G,
6. obsah sběrné zkumavky jsem slila, na kolonku jsem nanasla 720 μ l PE pufru a stočila 1 minutu 13 000 G,
7. obsah sběrné zkumavky jsem opět slila a kolonku jsem vysušila točením 2 minuty při 17 000 G,
8. kolonku jsem přenesla do čisté 1,5ml mikrozkuvky, nanasla jsem na ni 20 – 40 μ l ddH₂O (dle intenzity emitovaného záření po elektroforéze), nechala inkubovat 2 minuty a centrifugovala 2 minuty při 17 000 G,
9. v případě potřeby jsem eluci opakovala.

Změřila jsem koncentraci extrahované DNA na NanoDropu 2000 (Thermo Scientific) oproti ddH₂O. Získaná DNA byla uložena krátkodobě při teplotě 2 – 8 °C v lednici, dlouhodobě byla skladována při teplotě -20 °C.

4.3.10 Sekvenace

Princip sekvenace

Sekvenace DNA je proces, při němž se určuje pořadí jednotlivých nukleotidů v DNA. V současnosti se nejčastěji používá upravená Sangerova metoda, která vyžaduje jednovláknovou DNA sloužící jako templát, DNA polymerasu a směs deoxynukleotidů s určitým malým množstvím dideoxynukleotidů (ddNTPs), které jsou fluorescenčně označené (každý ddNTPs je označen jinou fluorescenční značkou). Ty jsou při syntéze nového vlákna náhodně zařazovány do reakce a ukončují elongaci vlákna (nemají volnou –OH skupinu v poloze 3' na ribose).

Vzniká tak směs různě dlouhých jednovláknových fragmentů DNA, které jsou v analyzátoru separovány elektroforeticky na základě délky řetězce. Detekce probíhá spektrofotometricky pomocí fluorescenčního detektoru.

Použité roztoky (neobsažené v komerčních kitech):

3M octan sodný

96% a 70% ethanol

formamid

Postup

Sekvenační reakce

Sekvenační reakci jsem připravila smícháním chemikálií uvedených v tabulce 4.10. Jednotlivé složky sekvenační reakce jsem pipetovala do 96jamkové destičky. Pro sekvenační reakci jsem použila kit BigDye Terminator kit v. 3.1 (obsahující pufr, dNTPs, ddNTPs a polymerasu; Applied Biosystems). Množství DNA přidané do reakce jsem vypočítala na základě koncentrace DNA a doporučení výrobce – tabulka 4.11. Program, který jsem používala při sekvenační reakci, je uveden v tabulce 4.12.

Příprava primerů pro sekvenaci

Při sekvenační reakci jsem používala již objednané primery (viz kap. 4.1.3). Ty jsem naředila na koncentraci $5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ smícháním 2,5 μl primeru a 47,5 μl ddH₂O.

Tabulka 4.10: Složení sekvenační reakce. Sekvenační mix je označení pro naředěnou směs ze sekvenačního kitu. Pokud bylo nutné do reakce přidat více produktu, přidával se na úkor vody.

	20 μl
Sekvenační mix.	1 μl
Primer	0,8 μl
Pufr	3,5 μl
ddH ₂ O	14,2 μl
Přečištěný PCR produkt	~0,5 μl
Celkem mixu	20 μl

Tabulka 4.11: Doporučené množství DNA přidávané do sekvenační reakce

Délka produktu	Množství produktu
100 – 200 bp	1 – 3 ng
200 – 500 pb	3 – 10 ng
500 – 1000 bp	5 – 20 ng
1000 – 2000 bp	10 – 40 ng
> 2000 bp	20 – 50 ng

Tabulka 4.12: Nastavení termocykléru pro sekvenační reakci

	Teplota [°C]	Čas
Denaturace	95	1 min
Denaturace	95	10 s
Annealing	50	5 s
Elongace	60	3 min
Ochlazení	10	1 min

Ehtanolová precipitace a denaturace

Pro odstranění přebytečných ddNTP jsem provedla ethanolovou precipitaci:

1. k sekvenační reakci (20 μl) jsem přidala 2 μl octanu sodného a 50 μl 96% vymraženého ethanolu a jamky uzavřela víčky,
2. směs jsem 15 minut inkubovala při pokojové teplotě, poté důkladně promíchala a destičku jsem centrifugovala 35 až 45 minut při cca 5750 G,
3. supernatant jsem opatrně odstranila překlopením destičky dnem vzhůru a takto překlopenou destičku jsem vysušila centrifugací při cca 750 G (1 minutu),

4. do jamek jsem nanesla 70 μ l 70% vymraženého ethanolu, jamky přikryla víčky a důkladně promíchala,
5. destičku jsem centrifugovala při cca 5750 G, supernatant opět opatrně vylila a jeho zbytky odstranila centrifugací (viz krok 3),
6. jamky jsem vysušila v cykléru (viz tabulka 4.13).

Pro konzervaci vzorku jsem k peletě se sekvenčními produkty přidala 15 μ l formamidu, destičku přikryla gumovým septem a nechala alespoň 15 minut inkubovat při pokojové teplotě za občasného promíchání vortexem. Poté jsem destičku 1 minutu centrifugovala při 2000 G, vzorky jsem denaturovala v cykléru (viz tab. 4.13) a do dalšího zpracování jsem destičku uložila do lednice.

Tabulka 4.13: Programy pro sušení a denaturaci produktů sekvenační reakce.

Program	Krok	Teplota [°C]	Čas
sušení	1	55	10 min
	2	10	10 s
denaturace	1	96	3 min
	2	4	10 s

Kapilární elektroforéza

Sekvence jsem prováděla na sekvenátoru ABI 3130 Genetic Analyzer od firmy Applied Biosystems. Elektrolytický pufr a polymer byly dodány firmou Applied Biosystems.

K zadávání vstupních dat jsem používala 3130 Genetic Analyzer Data Collection Software v3.0. K vyhodnocování dat jsem používala SeqScape Software v2.6.

Sekvenované geny

Sekvenovala jsem geny kódující apolipoprotein E a apolipoprotein F, jejichž produkty jsem získala z genomové DNA. Z důvodu nesrovnalostí mezi referenční a sekvenovanou sekvencí genu pro apo F jsem sekvenovala i cDNA, která byla získána z potkanů utracených při pokusech za účelem analýzy genové exprese v játrech (červen 2007).

4.4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu *STATISTICA*, v. 5.5 (StatSoft, Inc.)

4.4.1 *Charakterizace nascentních VLDL*

Porovnání koncentrace TG (po logaritmické transformaci) a koncentrace cholesterolu mezi jednotlivými skupinami bylo provedeno parametrickými testy.

Pro zjištění rozdílů v koncentraci cholesterolu a TG před aplikací tyloxapolu a po ní jsem použila párové t-testy. Pro zjištění rozdílů v koncentraci cholesterolu mezi kmeny i u zvířat stejného kmene na různých dietách a pro hodnocení rozdílů (změny) těchto koncentrace cholesterolu a TG byla použita dvoucestná ANOVA.

Protože stanovení koncentrace cholesterolu a TG ve VLDL částicích bylo provedeno jen u tří vzorků na skupinu, tato data jsem statisticky nehodnotila.

4.4.2 *Aldehyddehydrogenasa 1a7*

Protože o rozdělení hodnot aktivity aldehyddehydrogenasy není mnoho známo a protože jsem použila skupiny s malým počtem potkanů, tato data jsem hodnotila neparametrickými testy.

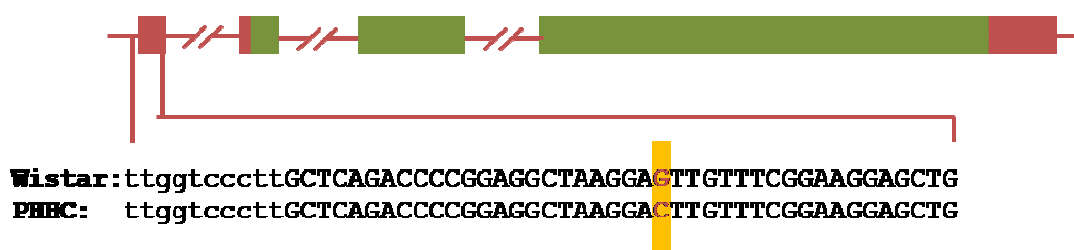
Pro zjištění rozdílů v aktivitě mezi jednotlivými skupinami jsem použila nejdříve Kruskal-Wallisův test. Vyplynuly-li z tohoto testu mezi skupinami rozdíly, hodnotila jsem je dále pomocí Mann-Whitneyho testu s použitím Bonferroniho korekce na hladinu významnosti.

5 VÝSLEDKY

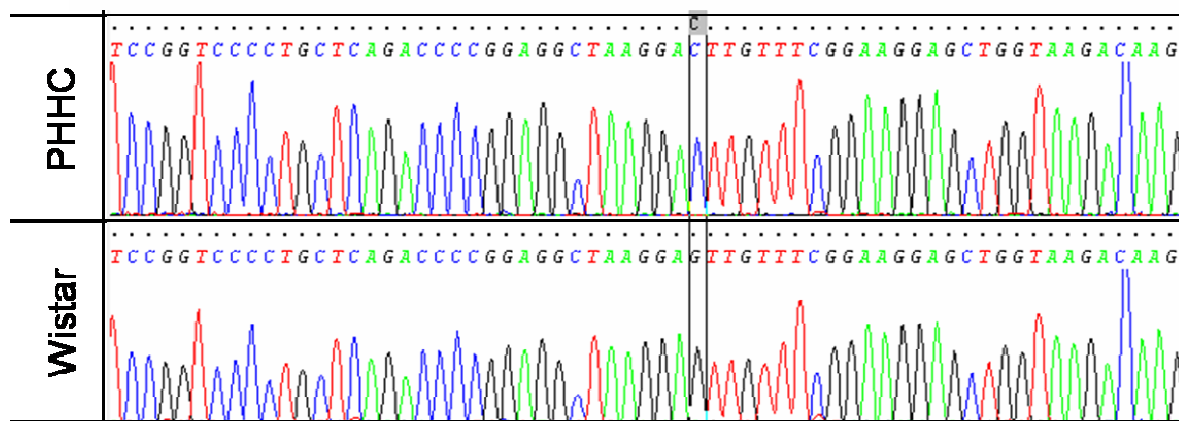
5.1 APOLIPOPROTEIN E

5.1.1 Sekvence genu *ApoE*

Sekvenovala jsem gen kódující apolipoprotein E u PHHC potkana a potkana Wistar. Nalezla jsem záměnu nukleotidu v pozici -42 od začátku translace – viz obrázek 5.1. Tato záměna se nachází v prvním, nepřekládaném exonu. Zbytek sekvence genu se mezi kmeny potkanů nelišil. Nalezený rozdíl mezi kmeny jsem potvrdila u dalších 4 PHHC potkanů a 4 potkanů Wistar.



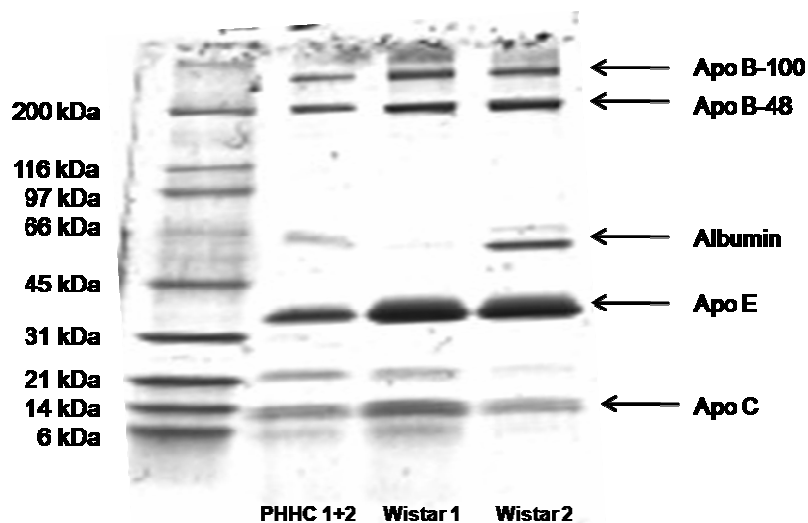
Obrázek 5.1: Schéma genu pro apolipoprotein E a nalezená záměna nukleotidu. Červeně – nepřekládaná oblast, zeleně – překládaná oblast. Výřez – část intronu před 1. exonem (malá písmena) a celý první exon (velká písmena).



Obrázek 5.2: Záměna nukleotidu v prvním exonu *ApoE* u PHHC potkana, data ze sekvenátoru.

5.1.2 Přítomnost apo E ve VLDL

Proteiny v ultracentrifugací získaných VLDL částicích jsem separovala pomocí SDS-PAGE. Jak je vidět na obrázku 5.3, apolipoprotein E byl přítomen ve VLDL obou kmenů.



Obrázek 5.3: Gradientový gel získaný SDS-PAGE delipidovaných VLDL

5.2 CHARAKTERIZACE NASCENTNÍCH VLDL

5.2.1 Koncentrace TG a cholesterolu v séru

Bazální cholesterolemie u potkanů Wistar nebyla v tomto experimentu ovlivněna podáním cholesterolové diety, PHHC potkani na cholesterolové dietě měli bazální koncentraci cholesterolu v séru vyšší proti oběma kontrolním dietám ($p < 0,005$) – viz tabulka 5.1. Bazální cholesterolemie byla u PHHC potkanů na všech dietách vyšší než u potkanů Wistar ($p < 0,005$).

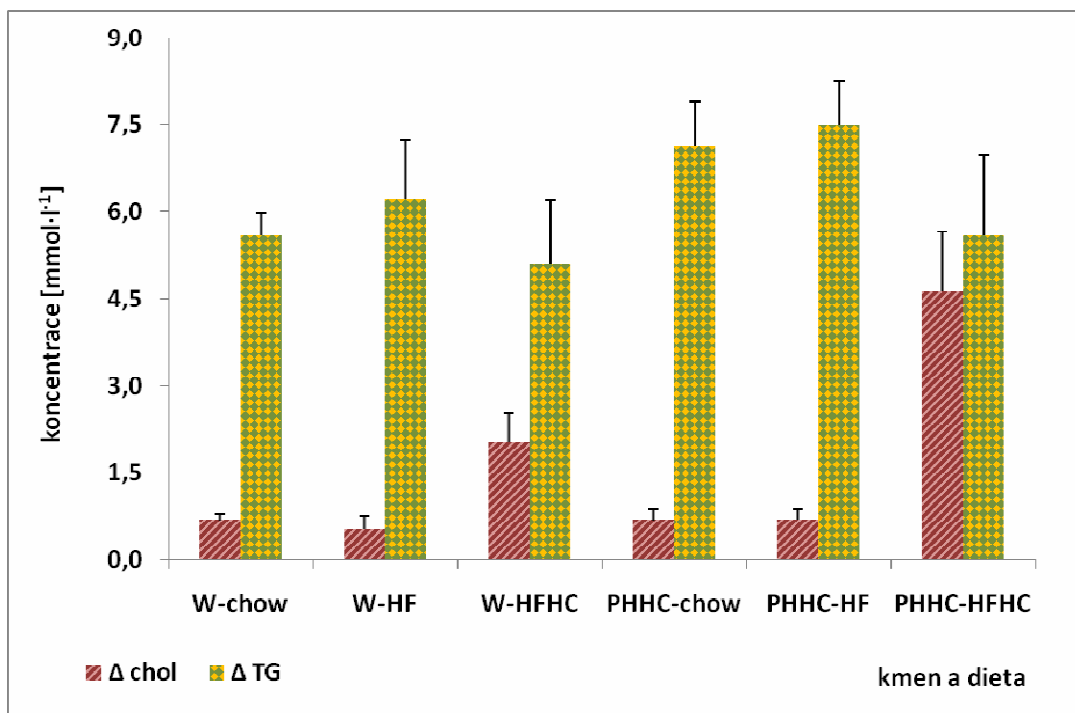
Tabulka 5.1: Bazální koncentrace cholesterolu a TG v séru (před aplikací tyloxapolu) a 2 hodiny po aplikaci tyloxapolu u PHHC a Wistar potkanů na jednotlivých dietách (chow – kontrolní, HF – tuková kontrolní, HFHC – cholesterolová). CH – cholesterol, TG – triacylglyceroly. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka. * počet zvířat ve skupině (PHHC;Wistar)

Dieta	PHHC potkani				Potkani Wistar			
	CH před [mmol.l ⁻¹]	CH po [mmol.l ⁻¹]	TG před [mmol.l ⁻¹]	TG po [mmol.l ⁻¹]	CH před [mmol.l ⁻¹]	CH po [mmol.l ⁻¹]	TG před [mmol.l ⁻¹]	TG po [mmol.l ⁻¹]
chow (5;4)*	2,20 ± 0,19	2,89 ± 0,16	0,87 ± 0,12	8,02 ± 0,86	1,30 ± 0,12	2,00 ± 0,17	1,00 ± 0,36	6,73 ± 0,62
HF (4;6)*	2,47 ± 0,30	3,25 ± 0,20	1,05 ± 0,28	8,48 ± 0,76	1,62 ± 0,27	2,15 ± 0,20	0,88 ± 0,32	7,10 ± 1,05
HFHC (5;6)*	3,21 ± 0,47	7,88 ± 1,25	1,14 ± 0,16	6,88 ± 1,35	1,53 ± 0,30	3,56 ± 0,67	0,90 ± 0,32	6,00 ± 1,26

Aplikace tyloxapolu vedla k vzestupu koncentrace TG i cholesterolu u PHHC i Wistar potkanů na všech dietách ($p < 0,005$).

Dále jsem hodnotila pouze přírůstek koncentrace těchto lipidových parametrů – viz graf 5.1.

V přírůstku koncentrace TG nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami, a to jak v rámci kmene, tak v rámci diet.



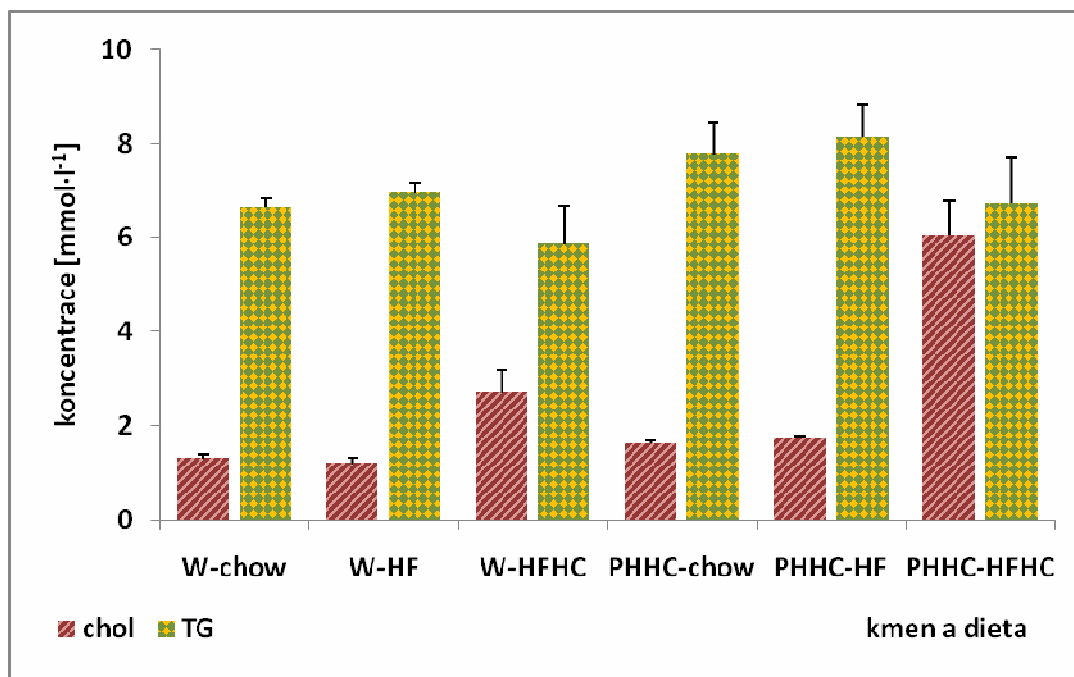
Graf 5.1 Změna (Δ) koncentrací cholesterolu a TG v séru 2 hodiny po aplikaci tyloxapolu. Chybové úsečky udávají SD.

Podání tukové diety neovlivnilo nárůst koncentrace cholesterolu po podání tyloxapolu ani u jednoho z kmenů.

Podání cholesterolové diety bylo spojeno s cca trojnásobným přírůstkem cholesterolémie u Wistar potkanů ($p < 0,05$) a s téměř šestinásobným u PHHC potkanů ($p < 0,001$) proti standardní dietě.

5.2.2 Koncentrace TG a cholesterolu ve VLDL

Koncentrace cholesterolu a TG ve VLDL izolovaných ze séra 2 hodiny po aplikaci tyloxapolu je zobrazena v grafu 5.2.

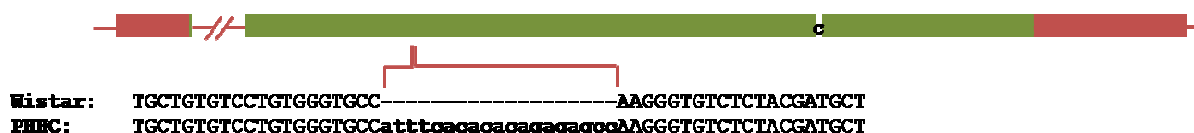


Graf 5.2: Koncentrace cholesterolu a TG ve VLDL 2 hodiny po aplikaci tyloxapolu. Chybové úsečky udávají SD.

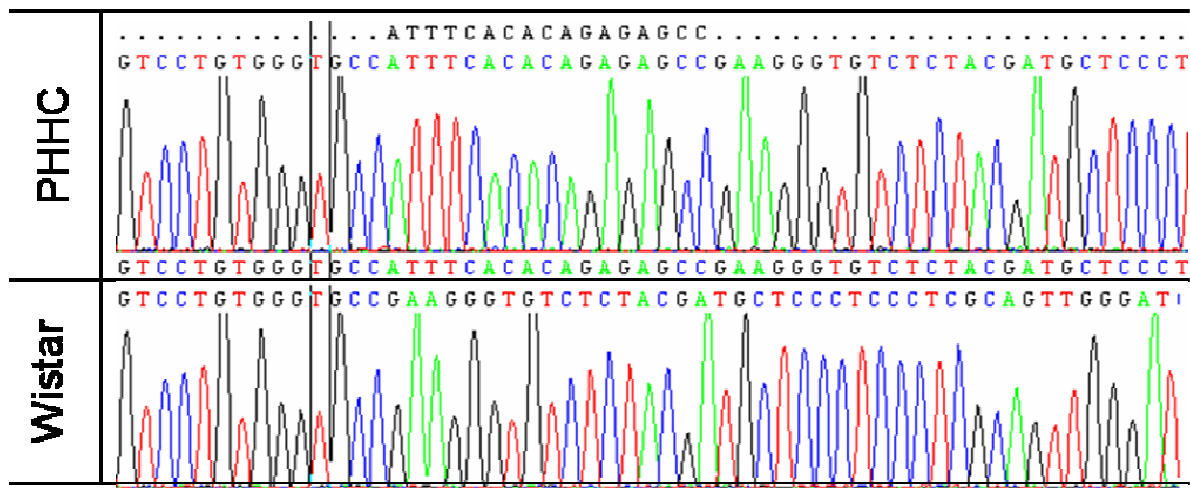
Poměr cholesterolu a TG ve VLDL zvířat obou kmenů na obou kontrolních dietách je pro potkany obvyklý. U potkanů Wistar na cholesterolové dietě došlo k navýšení koncentrace cholesterolu ve VLDL, nicméně částice byly stále tvořeny převážně TG. U PHHC potkanů na cholesterolové dietě se ale poměr cholesterolu a TG ve VLDL téměř vyrovnal.

5.3 SEKVENACE GENU APOF

Sekvenovala jsem gen kódující apolipoprotein F u PHHC a Wistar potkanů. U PHHC potkanů jsem našla nepublikovanou 17nukleotidovou inzerci ATTTACACACAGAGAGCC v pozici 92 – 93 od začátku translace (2. exon) – viz obr. 5.4 a obr. 5.5.

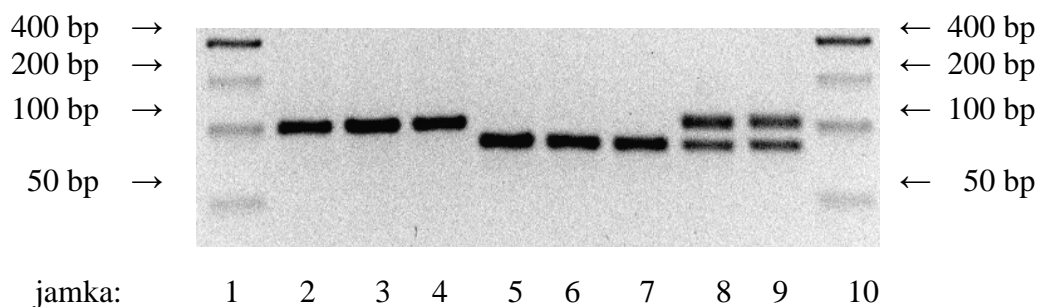


Obr. 5.4: Schéma genu pro apolipoprotein F a nalezené inzerci. Červeně – nepřekládaná oblast, zeleně – překládaná oblast, c – cytidin dle databáze Ensembl označený jako intron mezi 2. – 3. exonem. Výřez – oblast inzerci (± 20 nukleotidů).



Obrázek 5.5: Inzerce 17 nukleotidů na záznamu ze sekvenátoru.

Pomocí PCR s primery navrženými pro krátký úsek v okolí inzerce (viz tab. 4.4) jsem zjišťovala frekvenci výskytu této inzerce u 19 PHHC a 24 Wistar potkanů – viz obr. 5.4.



Obr. 5.4: Výsledky PCR pro zjištění přítomnosti inzerce (výřez z 3% agarosového gelu). Jamka 1 a 10: 50 bp standard, jamky 2 – 4 PHHC potkani s inzercí přítomnou v obou alelách (+/+); jamky 5 – 7: potkani Wistar s úplnou absencí inzerce (-/-); jamky 8, 9: Wistar potkani s přítomností inzerce v jedné alele (+/-).

Jako templát sloužily genomové DNA získané z potkanů použitých při pokusech za účelem analýzy genové exprese v játrech (červen 2007). Všichni PHHC potkani byli homozygotní pro přítomnost této inzerce, 25 % potkanů Wistar bylo pro inzerce heterozygotní - viz tabulka 5.3.

Tabulka 5.3: Alelická frekvence výskytu inzerce ve 2. exonu genu *ApoF*

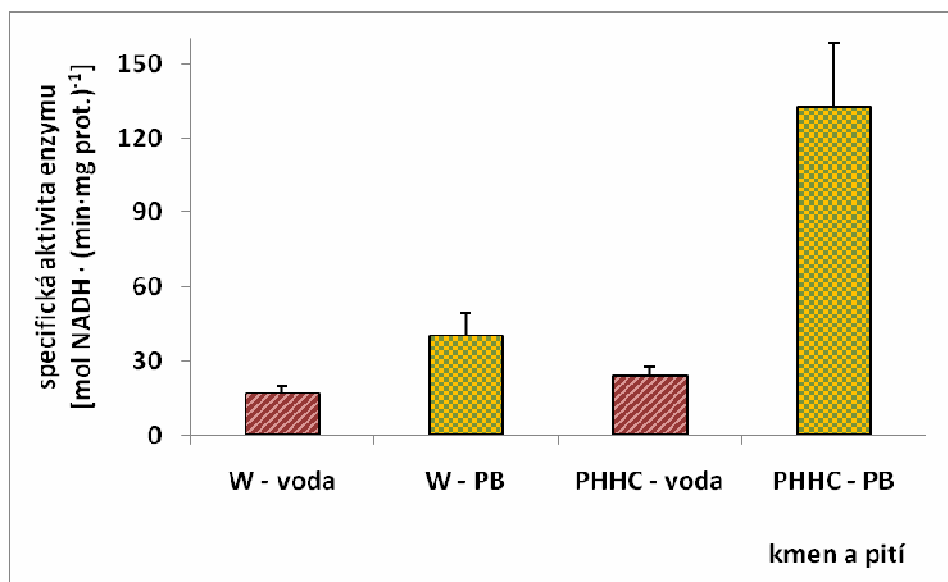
Kmen	Alelická frekvence	
	s inzercí	bez inzerce
PHHC (n = 19)	100 %	0 %
Wistar (n = 24)	12,5 %	87,5 %

Při sekvenaci gDNA jsem zjistila u PHHC i Wistar potkanů delecí cytidinu v pozici + 695 od předpokládaného začátku translace. Tuto delecí jsem při sekvenaci cDNA rovněž nenalezla. Při porovnání s publikovanými sekvenacemi gDNA a mRNA (NCBI i Ensembl) jsme zjistili, že jde o chybu v databázích.

5.4 STANOVENÍ AKTIVITY ALDEHYDDEHYDROGENASY 1A7

5.4.1 Indukce aldehyddehydrogenasy 1a7 fenobarbitalem

Při pokusu s indukcí enzymu fenobarbitalem jsem zaznamenala zvýšení aktivity enzymu u zvířat napájených fenobarbitalem, a to u obou kmenů – viz graf 5.3. U potkanů Wistar došlo k nárůstu specifické aktivity o 140 % ($p < 0,01$), u PHHC potkanů dokonce více než o 450 % ($p < 0,01$).



Graf 5.3: Specifická aktivita aldehyddehydrogenasy 1a7 u potkanů napájených čistou vodou a vodou s fenobarbitalem (PB). Chybové úsečky představují SD.

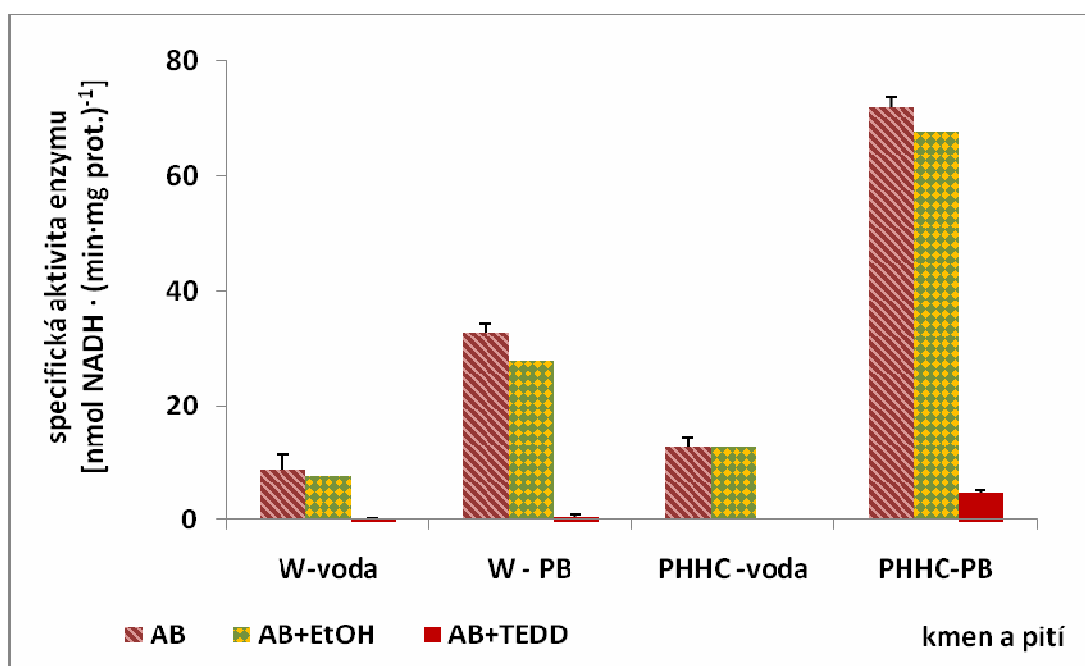
Při odběru jater jsem zjistila, že zvířata pijící fenobarbital měla významně zvýšenou relativní hmotnost jater (vzhledem k hmotnosti těla) o 30 % u potkanů Wistar a o 34 % u PHHC potkanů - viz tabulka 5.4.

Tabulka 5.4: Hmotnosti potkanů napájených vodou a fenobarbitalem a jejich jater, data jsou průměr ± směrodatná odchylka.

	PHHC potkan		Potkan Wistar	
	m zvířete [g]	m jater [g]	m zvířete [g]	m jater [g]
voda	401 ± 16	14,6 ± 1,2	332 ± 23	15,8 ± 1,6
fenobarbital	379 ± 12	18,3 ± 0,7	342 ± 38	21,6 ± 2,2

Inhibice aldehyddehydrogenasy 1a7 disulfiramem

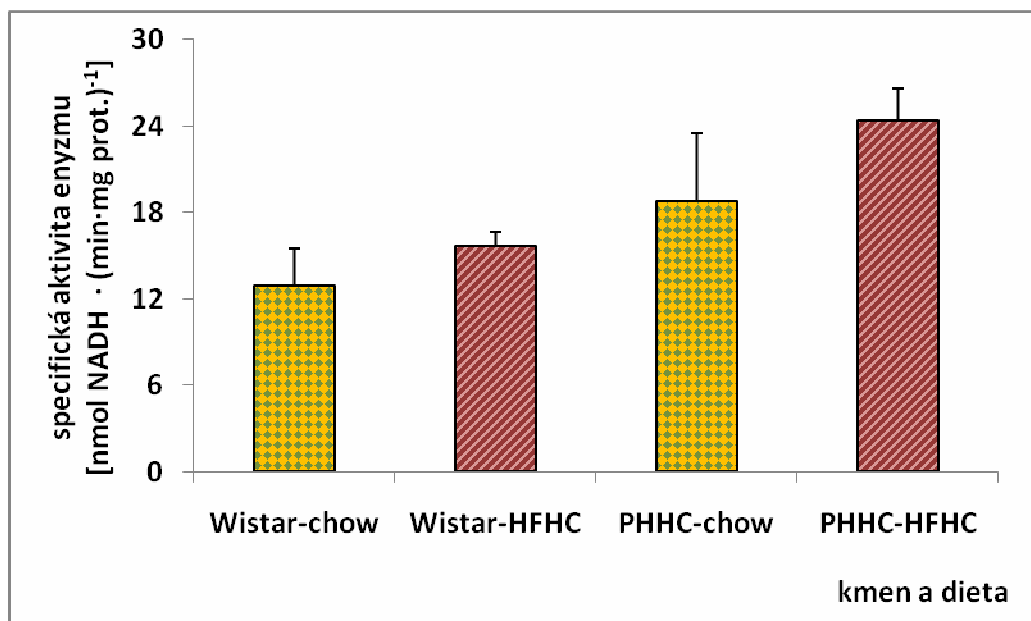
V přítomnosti disulfiramu došlo ve všech testovaných vzorcích k téměř úplné inhibici enzymu – viz graf 5.4. Samotný ethanol v množství, které bylo přítomno v reakční směsi, neměl na aktivitu výrazný vliv. Data nebyla statisticky hodnocena.



Graf 5.4: Specifická aktivita aldehyddehydrogenasy 1a7 v pufru (AB), pufru s ethanolem (AB+EtOH) a pufru s disulfiramem (AB+EtOH+TEDD). Chybové úsečky představují SD.

5.4.2 Stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7 u potkanů na různých dietách

Dieta neměla žádný statisticky významný vliv na aktivitu enzymu u obou kmenů potkanů – viz graf 5.5.



Graf 5.5: Specifická aktivita aldehyddehydrogenasy 1a7 u potkanů na standardní (chow) a cholesterolové (HFHC) dietě. Chybové úsečky představují SD.

Stejně jako u předchozího pokusu, nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi oběma kmeny na standardní dietě. Signifikantní rozdíl jsem zaznamenala až mezi kmeny na cholesterolové dietě, kdy PHHC potkani měli ve srovnání s potkany Wistar aktivitu zvýšenou o 56 % ($p < 0,005$).

6 DISKUZE

Cílem mé práce bylo pokusit se objasnit některé aspekty patogeneze hypercholesterolemie Pražského hereditárně hypercholesterolemického potkana. PHHC potkan, u kterého lze hypercholesterolemii indukovat pouhým podáním dietního cholesterolu, představuje zcela unikátní model pro studium hypercholesterolemie. Hypercholesterolemie u PHHC potkana je charakterizována výrazně zvýšenou koncentrací cholesterolu v lipoproteinech, které jsou považovány za aterogenní (LDL, IDL a VLDL). U jiného modelu hypercholesterolemie u potkana vyšlechtěného podobným způsobem, potkanů RICO, dochází k vzestupu cholesterolemie především v HDL (96). Hypercholesterolemii lze vyvolat i u jiných linií potkanů, přidá-li se k cholesterolové dietě i kyselina cholová blokující základní metabolickou dráhu eliminace cholesterolu. Kyselina cholová je však v množství, ve kterém je potkanům podávána, hepatotoxická (97), což použití takových modelů limituje. I když byl již v 80. letech mechanismus hypercholesterolemie u PHHC potkana poměrně důkladně studován (85), nebyly mezi PHHC potkany a potkany Wistar nalezeny zásadní rozdíly v regulaci syntézy cholesterolu v játrech, clearanci LDL ani v absorpci cholesterolu ve střevě. V té době bylo také zjištěno, že hypercholesterolemie je zřejmě polygenního původu. Tento nálezn činí PHHC potkany ještě zajímavějšími, neboť podstatná část geneticky podmíněných hypercholesterolemii u člověka je rovněž polygenního původu. Geny, které jsou u člověka za jejich rozvoj odpovědné, nebyly dosud jednoznačně identifikovány a charakterizovány. Vysvětlení patogeneze hypercholesterolemie u PHHC potkana by tak mohlo přispět k identifikaci dalších genů, případně metabolických drah, které mohou hrát úlohu v patogenezi polygenní hypercholesterolemie i u lidí.

6.1 AKUMULACE CHOLESTEROLEM OBOHACENÝCH VLDL

V první části své práce jsem se pokusila vysvětlit mechanismus, jakým vznikají u PHHC potkanů cholesterolem obohacené VLDL. Jak již bylo ukázáno v teoretické části mé magisterské práce, základní funkcí VLDL je přenášet endogenní TG z jater do mimojaterních tkání. Tomu odpovídá i to, že TG jsou hlavní komponentou VLDL – poměr VLDL-cholesterol/VLDL-TG se u potkanů pohybuje okolo hodnoty 0,2. U PHHC potkanů na cholesterolové dietě tento poměr výrazně vzrůstá a obvykle přesahuje hodnotu 1. U člověka v lačnickém stavu se tento poměr obvykle pohybuje kolem hodnoty 0,45 a je poměrně konstantní. Výjimkou jsou ovšem pacienti s dysbetalipoproteinémií

(hyperlipoproteinémie typu III), u kterých tento poměr obvykle dosahuje hodnot kolem 1,0. Toto autozomálně recesivní onemocnění se projevuje u homozygotních nositelů varianty apolipoproteinu E označované jako E2. Apo E2 neinteraguje s LDL receptory, což vede k akumulaci cholesterolu v částicích VLDL a IDL, ale nikoli v LDL, které bývají dokonce sníženy. Distribuce cholesterolu v lipoproteinech u pacientů s dysbetalipoproteinémií tedy velice připomíná distribuci, kterou můžeme pozorovat u PHHC potkana krmeného cholesterolovou dietou. Lze tedy předpokládat, že akumulace cholesterolu ve VLDL a IDL u PHHC potkanů může být výsledkem defektní funkce apolipoproteinu E.

Proto jsem sekvenovala kódující oblasti genu pro apolipoprotein E (*ApoE*) u potkanů PHHC a získanou sekvenci porovnávala se sekvencí *ApoE* u potkanů Wistar a publikovanou sekvencí (88). Nalezenou záměnu (G>C v pozici +24 od začátku transkripce) jsem nenalezla u žádného z 5 potkanů Wistar a nebyla doposud ani publikována. Záměna se ale nachází v 1. exonu, který není překládán, protože startovní kodon se nachází až v druhém exonu. Tato mutace by tedy neměla ovlivnit sekvenci překládaného apolipoproteinu E a nelze tedy předpokládat, že ovlivní interakci apo E s receptory. Nicméně bylo zjištěno, že tento exon ovlivňuje expresi tohoto genu jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu (98, 99). Abychom tedy vyloučili možnost, že námi nalezená záměna zásadně snižuje rychlost transkripce a tím i množství proteinu v cirkulaci, pokusili jsme zjistit, zda je apo E přítomen ve VLDL u PHHC potkanů. Průkaz přítomnosti proteinu jsem provedla pomocí SDS PAGE na delipidovaných VLDL potkanů Wistar i PHHC a zjistila jsem, že protein, odpovídající svou pohyblivostí apo E, je přítomen u obou linií potkana ve srovnatelné koncentraci. Je tedy nepravděpodobné, že by příčina akumulace cholesterolu ve VLDL a IDL částicích u PHHC potkanů na cholesterolové dietě měla stejný genetický podklad jako familiární dysbetalipoproteinémie u člověka.

Skutečnost, že částice VLDL u PHHC potkanů na cholesterolové dietě jsou obohaceny cholesterolem lze ovšem vysvětlit i tak, že k jejich obohacení cholesterolem dochází již v průběhu jejich syntézy („assembly“) v játrech. Tuto možnost jsme se rozhodli ověřit v pokusech, ve kterých byl potkanům in vivo aplikován tyloxapol (Triton WR-1339). Ten působí jako inhibitor lipoproteinové lipasy a blokuje tak hydrolýzu triacylglycerolů ve VLDL. Částice VLDL se potom hromadí v cirkulaci a jejich složení (včetně poměru cholesterolu a TG) zůstává beze změny. Lze je tedy považovat za nascentní VLDL.

Dvě hodiny po aplikaci tyloxapolu došlo u všech skupin potkanů k několikanásobnému vzestupu koncentrace TG, což svědčí o tom, že LPL byla skutečně inhibována. Tento nálezn je v souladu s výsledky jiných autorů (92). Současne došlo i k mírnému vzestupu koncentrace cholesterolu u všech skupin potkanů na kontrolních dietách. U potkanů Wistar na cholesterolové dietě byl vzestup cholesterolémie cca trojnásobný a u PHHC potkanů dokonce šestinásobný (viz graf 5.1). Když jsme tyto výsledky porovnali se složením VLDL po aplikaci tyloxapolu, bylo zřejmé, že za přírůstek cholesterolémie stejně jako přírůstek triacylglycerolémie odpovídají výhradně změny koncentrace VLDL (viz graf 5.1). Prokázali jsme tedy, že cholesterolem obohacené VLDL vznikají u PHHC potkanů na cholesterolové dietě již v játrech.

I když v tomto okamžiku zatím nemůžeme činit žádné definitivní závěry, lze vyslovit hypotézu, že tyto cholesterolem obohacené částice VLDL nemohou být ani po hydrolyze jejich TG vzhledem ke své velikosti normálně katabolizovány a hromadí se v cirkulaci.

6.2 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH GENŮ

Druhá část mé práce vycházela z výsledků analýzy jaterního transkriptomu, která identifikovala několik genů, jejichž exprese se mezi oběma kmeny významně lišila. Ve své práci jsem se soustředila na dva z těchto genů. Mým cílem bylo zavést metodu pro stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7 a stanovit aktivitu tohoto enzymu u PHHC potkanů i potkanů Wistar na různých dietách a ověřit, zda rozdíly v aktivitě enzymu mezi oběma kmeny odpovídají rozdílům v genové expresi. Dalším cílem bylo sekvenovat u PHHC potkanů gen kódující apolipoprotein F, jediný gen, který vykazuje souvislost s metabolismem apolipoproteinů.

6.2.1 Stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7

Zavedla jsem metodu pro stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7. Protože je tento enzym členem velké rodiny proteinů, které jsou si velmi podobné jak svou sekvencí, tak strukturou, metodu jsem validovala ve dvou experimentech. Prokázala jsem, že u obou použitých linií potkana je aktivita enzymu indukovatelná fenobarbitalem v souladu s nálezy jiných autorů (100, 86). Dále jsem ověřila, že je námi měřená aktivita enzymu inhibována

50 μ M disulfiramem, který je specifickým inhibitorem aldehyddehydrogenasy 1a7. Námi stanovené hodnoty aktivity jsou výrazně vyšší než údaje v literatuře (101), ale na rozdíl od mé práce nebyla v těchto pracích určována počáteční rychlost reakce.

Expresse aldehyddehydrogenasy 1a7 byla u potkanů PHHC zvýšena cca o 50%, i když rozdíl mezi oběma kmeny byl statisticky významný pouze na cholesterolové dietě. Tento nález je v rozporu s výsledky analýzy transkriptomu, kde byla u PHHC potkanů zjištěna 25násobně zvýšená koncentrace mRNA pro *Aldh1a7*. Když byly výsledky analýzy genové exprese validovány metodou real-time PCR, bylo zjištěno, že exprese genu je u PHHC potkanů zvýšena dokonce 200x.

V současné době nemáme pro tento rozpor ve výsledcích stanovení aktivity enzymu a genové exprese v játrech vysvětlení. Jako nejpravděpodobnější se jeví možnost, že *Aldh1a7* u PHHC potkanů nese mutaci, která je spojena s výrazně sníženou aktivitou enzymu. Aby byla aktivita enzymu udržena na stejné úrovni jako u potkanů Wistar, musela by odpovídajícím způsobem vzrůst i transkripce enzymu. Nemůžeme ovšem vyloučit možnost, že mutace je přítomna v regulačních oblastech genu.

O tom, že přítomnost tohoto proteinu je pro hepatocyt důležitá, svědčí skutečnost, že určitou hladinu bazální aktivity enzymu mají i potkani Wistar. Fyziologický význam funkce tohoto enzymu v organismu ale není dosud přesně znám. Rovněž není jasné, zda další studium tohoto enzymu může významně přispět ke studiu patogeneze hypercholesterolemie u člověka, neboť nejbližším lidským homologem je gen *ALDH1A1*, kódující retinaldehyddehydrogenasu. Retinal ale není substrátem pro potkaní *Aldh1a7*.

6.2.2 Sekvenace *ApoF*

Jediným genem odlišně exprimovaným u PHHC potkanů, který by mohl souviset s metabolismem lipoproteinů je *ApoF*. Protein kódovaný lidským analogem tohoto genu (*APOF*) inhibuje CETP. Protože ale potkani CETP nemají, není jasné, jakou úlohu apo F u potkana hraje. Rozhodli jsme se proto tento gen u potkana sekvenovat.

Sekvenací tohoto genu jsem u PHHC potkanů zjistila přítomnost inserce o délce 17 nukleotidů ve druhém exonu. S pomocí PCR jsem potom zjistila, že zřejmě všichni PHHC potkani jsou pro přítomnost této inserce homozygotní. Tuto inserci jsem ale našla i u potkanů Wistar, u kterých se ale vyskytovala s poměrně nízkou frekvencí – 25% zvířat bylo heterozygotními nositeli této varianty genu.

Tento náález naznačuje, že tato inserce, resp. její homozygotní přítomnost u PHHC potkanů, se vyseletovala při selekci PHHC potkanů z potkanů Wistar. *ApoE* by tedy mohl být skutečně kandidátním genem, který ovlivňuje rozvoj hypercholesterolemie.

ApoE kóduje proprotein, který má 308 aminokyselin, přičemž se předpokládá, že vlastní funkční protein vzniká další posttranslační modifikací a je tvořen 154 aminokyselinami C-konce peptidu (102). Inserce mění čtecí rámec a vnáší do sekvence předčasný stop kodon. Vznikající produkt má prvních 31 AK stejných a celkem obsahuje 81 AK. Potkani nesoucí homozygotní inserci pravděpodobně netvoří funkční protein.

Protože je ale funkce tohoto proteinu u potkanů neznámá, nevíme, jaké by měly být důsledky jeho absence. Vzhledem k expresi tohoto proteinu v játrech a skutečnosti, že u člověka v cirkulaci ovlivňuje výměnu esterů cholesterolu a TG mezi lipoproteiny, lze spekulovat, že by mohl hrát úlohu v procesu, ve kterém jsou TG a estery cholesterolu inkorporovány do nově vznikajících částic VLDL v játrech. To by odpovídalo našemu pozorování, že PHHC potkani produkují cholesterolem obohacené VLDL.

V dalších experimentech bude ale třeba ověřit, že tento protein u PHHC potkanů skutečně chybí. Jeho úlohu v rozvoji hypercholesterolemie bude možné testovat i křížením heterozygotních potkanů Wistar s cílem získat homozygotní zvířata a testovat odpověď těchto zvířat na dietní cholesterol.

7 ZÁVĚR

Zjistila jsem, že akumulace VLDL částic abnormálně obohacených cholesterolem u PHHC potkana na cholesterolové dietě je způsobena syntézou takových VLDL již v játrech. Vyloučila jsem možnost, že akumulace těchto VLDL souvisí s defektem v genu kódujícím apolipoprotein E u PHHC potkana.

Zavedla jsem metodu pro stanovení aktivity aldehyddehydrogenasy 1a7 a zjistila, že rozdíl v aktivitě aldehyddehydrogenasy 1a7 mezi PHHC potkany a potkany Wistar je podstatně menší než dříve pozorovaný rozdíl v expresi genu kódujícího tento enzym.

Zjistila jsem, že PHHC potkani mají v genu kódujícím apolipoprotein F inzerci 17 nukleotidů, která posouvá čtecí rámec a vnáší předčasný stop kodon. Tato inzerce se u Wistar potkanů vyskytuje jen u 25 % jedinců v heterozygotní formě.

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. ČEŠKA, R. (2002) *Diagnostika a léčba hyperlipoproteinémií* (Praha, TRITON).
2. ČEŠKA, R. & SVOBODOVÁ, H. (2005) Ateroskleróza a rizikové faktory, in: Češka, R. a kol. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*, pp. 15-35 (Praha, TRITON).
3. ČEŠKA, R. & SVOBODOVÁ, H. (2005) Plazmatické lipidy, lipoproteiny a apolipoproteiny, in: Češka, R. a kol. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*, pp. 37-59 (Praha, TRITON).
4. MAYES, P. A. (2002) Synthesa, transport a vylučování cholesterolu, in: Murray, R. K. a kol. *Harperova biochemie*, pp. 279-291 (Jinočany, Nakladatelství a vydavatelství H+H).
5. IKONEN, E. (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 125-38.
6. BUHMAN, K. F., ACCAD, M. & FARESE, R. V. (2000) Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases, *Biochim Biophys Acta*, 1529, 142-54.
7. GANONG, W. F. (2005) *Přehled lékařské fyziologie* (Praha, Galén).
8. MAYES, P. A. (2002) Metabolismus acylglycerolů a sfingolipidů, in: Murray, R. K. *Harperova biochemie*, pp. 252-261 (Jinočany, Nakladatelství a vydavatelství H+H).
9. KODÍČEK, M. (2004) *Biochemické pojmy - výkladový slovník* (Praha, VŠCHT).
10. GRUNDY, S. M. (1990) *Atlas of Lipid Disorders, Unit 1* (New York, Merck Sharp & Dohme).
11. GOTTO, A. M., JR., POWNALL, H. J. & HAVEL, R. J. (1986) Introduction to the plasma lipoproteins, *Methods Enzymol*, 128, 3-41.
12. MAHLEY, R. W., INNERARITY, T. L., RALL, S. C., JR. & WEISGRABER, K. H. (1984) Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function, *J Lipid Res*, 25, 1277-94.
13. GOTTO, A. M. & POWNALL, H. (2003) *Manual od Lipid Disorders. Reducing the Risk for Coronary Heart Disease* (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins).
14. FIELDING, C. J., SHORE, V. G. & FIELDING, P. E. (1972) A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase, *Biochem Biophys Res Commun*, 46, 1493-8.
15. THOMAS, M. J., BHAT, S. & SORCI-THOMAS, M. G. (2008) Three-dimensional models of HDL apoA-I: implications for its assembly and function, *J Lipid Res*, 49, 1875-83.
16. ZANNIS, V. I., CHRONI, A. & KRIEGER, M. (2006) Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL, *J Mol Med*, 84, 276-94.
17. CHEUNG, M. C. & ALBERS, J. J. (1982) Distribution of high density lipoprotein particles with different apoprotein composition: particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II, *J Lipid Res*, 23, 747-53.
18. CHEUNG, M. C. & ALBERS, J. J. (1984) Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II, *J Biol Chem*, 259, 12201-9.

19. GREEN, P. H., GLICKMAN, R. M., RILEY, J. W. & QUINET, E. (1980) Human apolipoprotein A-IV. Intestinal origin and distribution in plasma, *J Clin Invest*, 65, 911-9.
20. GOLDBERG, I. J., SCHERALDI, C. A., YACOUB, L. K., SAXENA, U. & BISGAIER, C. L. (1990) Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV, *J Biol Chem*, 265, 4266-72.
21. STAN, S., DELVIN, E., LAMBERT, M., SEIDMAN, E. & LEVY, E. (2003) Apo A-IV: an update on regulation and physiologic functions, *Biochim Biophys Acta*, 1631, 177-87.
22. OLOFSSON, S. O. & BOREN, J. (2005) Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis, *J Intern Med*, 258, 395-410.
23. POWELL, L. M., WALLIS, S. C., PEASE, R. J. et al. (1987) A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine, *Cell*, 50, 831-40.
24. CHEN, S. H., HABIB, G., YANG, C. Y. et al. (1987) Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon, *Science*, 238, 363-6.
25. LAROSA, J. C., LEVY, R. I., HERBERT, P., LUX, S. E. & FREDRICKSON, D. S. (1970) A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase, *Biochem Biophys Res Commun*, 41, 57-62.
26. SOUTAR, A. K., GARNER, C. W., BAKER, H. N. et al. (1975) Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase, *Biochemistry*, 14, 3057-64.
27. WANG, C. S., MCCONATHY, W. J., KLOER, H. U. & ALAUPOVIC, P. (1985) Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III, *J Clin Invest*, 75, 384-90.
28. ZANNIS, V. I., BRESLOW, J. L., UTERMANN, G. et al. (1982) Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes, *J Lipid Res*, 23, 911-4.
29. HATTERS, D. M., PETERS-LIBEU, C. A. & WEISGRABER, K. H. (2006) Apolipoprotein E structure: insights into function, *Trends Biochem Sci*, 31, 445-54.
30. NIMPF, J. & SCHNEIDER, W. J. (2000) From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2, *Biochim Biophys Acta*, 1529, 287-98.
31. BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. (1979) Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3330-7.
32. HERZ, J., HAMANN, U., ROGNE, S. et al. (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor, *EMBO J*, 7, 4119-27.
33. WILLNOW, T. E. (1999) The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism, *J Mol Med*, 77, 306-15.
34. TAKAHASHI, S., KAWARABAYASI, Y., NAKAI, T., SAKAI, J. & YAMAMOTO, T. (1992) Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 9252-6.

35. GOLDSTEIN, J. L., HO, Y. K., BASU, S. K. & BROWN, M. S. (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 333-7.
36. VAN BERKEL, T. J., OUT, R., HOEKSTRA, M. et al. (2005) Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis?, *Curr Opin Lipidol*, 16, 525-35.
37. ARESCHOUG, T. & GORDON, S. (2009) Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis, *Cell Microbiol*, 11, 1160-9.
38. MOORE, K. J. & FREEMAN, M. W. (2006) Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 1702-11.
39. MURPHY, J. E., TEDBURY, P. R., HOMER-VANNIASINKAM, S., WALKER, J. H. & PONNAMBALAM, S. (2005) Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors, *Atherosclerosis*, 182, 1-15.
40. ACTON, S. L., SCHERER, P. E., LODISH, H. F. & KRIEGER, M. (1994) Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor, *J Biol Chem*, 269, 21003-9.
41. ACTON, S., RIGOTTI, A., LANDSCHULZ, K. T. et al. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor, *Science*, 271, 518-20.
42. CONNELLY, M. A. & WILLIAMS, D. L. (2004) SR-BI and HDL cholesteryl ester metabolism, *Endocr Res*, 30, 697-703.
43. KRIEGER, M. (2001) Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems, *J Clin Invest*, 108, 793-7.
44. TAKAHASHI, K., KIMURA, Y., NAGATA, K. et al. (2005) ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis, *Med Mol Morphol*, 38, 2-12.
45. DEAN, M. & ALLIKMETS, R. (2001) Complete characterization of the human ABC gene family, *J Bioenerg Biomembr*, 33, 475-9.
46. ORAM, J. F. & VAUGHAN, A. M. (2006) ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease, *Circ Res*, 99, 1031-43.
47. WANG, N., LAN, D., CHEN, W., MATSUURA, F. & TALL, A. R. (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9774-9.
48. VELAMAKANNI, S., WEI, S. L., JANVILISRI, T. & VAN VEEN, H. W. (2007) ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles : a brief overview, *J Bioenerg Biomembr*, 39, 465-71.
49. SCANU, A. (1966) Serum high-density lipoprotein: effect of change in structure on activity of chicken adipose tissue lipase, *Science*, 153, 640-1.
50. HAHN, P. F. (1943) Abolishment of Alimentary Lipemia Following Injection of Heparin, *Science*, 98, 19-20.
51. MEAD, J. R., IRVINE, S. A. & RAMJI, D. P. (2002) Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease, *J Mol Med*, 80, 753-69.

52. HEEREN, J., NIEMEIER, A., MERKEL, M. & BEISIEGEL, U. (2002) Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo, *J Mol Med*, 80, 576-84.
53. JANSEN, H., VERHOEVEN, A. J. & SIJBRANDS, E. J. (2002) Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein?, *J Lipid Res*, 43, 1352-62.
54. THUREN, T. (2000) Hepatic lipase and HDL metabolism, *Curr Opin Lipidol*, 11, 277-83.
55. SANTAMARINA-FOJO, S., GONZALEZ-NAVARRO, H., FREEMAN, L., WAGNER, E. & NONG, Z. (2004) Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1750-4.
56. HIRATA, K., DICHEK, H. L., CIOFFI, J. A. et al. (1999) Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family, *J Biol Chem*, 274, 14170-5.
57. JAYE, M., LYNCH, K. J., KRAWIEC, J. et al. (1999) A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism, *Nat Genet*, 21, 424-8.
58. JAYE, M. & KRAWIEC, J. (2004) Endothelial lipase and HDL metabolism, *Curr Opin Lipidol*, 15, 183-9.
59. BADELLINO, K. O. & RADER, D. J. (2004) The role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, *Curr Opin Cardiol*, 19, 392-5.
60. GLOMSET, J. A. (1962) The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase, *Biochim Biophys Acta*, 65, 128-35.
61. ZILVERSMIT, D. B., HUGHES, L. B. & BALMER, J. (1975) Stimulation of cholesterol ester exchange by lipoprotein-free rabbit plasma, *Biochim Biophys Acta*, 409, 393-8.
62. PATTNAIK, N. M., MONTES, A., HUGHES, L. B. & ZILVERSMIT, D. B. (1978) Cholesteryl ester exchange protein in human plasma isolation and characterization, *Biochim Biophys Acta*, 530, 428-38.
63. MORTON, R. E. (1999) Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein, *Curr Opin Lipidol*, 10, 321-7.
64. INAZU, A., KOIZUMI, J. & MABUCHI, H. (2000) Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol*, 11, 389-96.
65. MORTON, R. E. & GREENE, D. J. (1994) Enhanced detection of lipid transfer inhibitor protein activity by an assay involving only low density lipoprotein, *J Lipid Res*, 35, 2094-9.
66. WANG, X., DRISCOLL, D. M. & MORTON, R. E. (1999) Molecular cloning and expression of lipid transfer inhibitor protein reveals its identity with apolipoprotein F, *J Biol Chem*, 274, 1814-20.
67. TALL, A. R., KRUMHOLZ, S., OLIVECRONA, T. & DECKELBAUM, R. J. (1985) Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange of phospholipids between very low density lipoproteins and high density lipoproteins during lipolysis, *J Lipid Res*, 26, 842-51.
68. OKA, T., KUJIRAOKA, T., ITO, M. et al. (2000) Distribution of phospholipid transfer protein in human plasma: presence of two forms of phospholipid transfer protein, one catalytically active and the other inactive, *J Lipid Res*, 41, 1651-7.

69. HUUSKONEN, J. & EHNHOLM, C. (2000) Phospholipid transfer protein in lipid metabolism, *Curr Opin Lipidol*, 11, 285-9.
70. HUSSAIN, M. M., FATMA, S., PAN, X. & IQBAL, J. (2005) Intestinal lipoprotein assembly, *Curr Opin Lipidol*, 16, 281-5.
71. REDGRAVE, T. G. (2004) Chylomicron metabolism, *Biochem Soc Trans*, 32, 79-82.
72. HUFF, M. W. & TELFORD, D. E. (1984) Characterization and metabolic fate of two very-low-density lipoprotein subfractions separated by heparin-sepharose chromatography, *Biochim Biophys Acta*, 796, 251-61.
73. STILLEMARCK-BILLTON, P., BECK, C., BOREN, J. & OLOFSSON, S. O. (2005) Relation of the size and intracellular sorting of apoB to the formation of VLDL 1 and VLDL 2, *J Lipid Res*, 46, 104-14.
74. BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, *Science*, 232, 34-47.
75. KRAUSS, R. M. & BURKE, D. J. (1982) Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans, *J Lipid Res*, 23, 97-104.
76. NIGON, F., LESNIK, P., ROUIS, M. & CHAPMAN, M. J. (1991) Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor, *J Lipid Res*, 32, 1741-53.
77. ANBER, V., GRIFFIN, B. A., MCCONNELL, M., PACKARD, C. J. & SHEPHERD, J. (1996) Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans, *Atherosclerosis*, 124, 261-71.
78. GALEANO, N. F., MILNE, R., MARCEL, Y. L. et al. (1994) Apoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein (LDL) is modified in small LDL but not in triglyceride-rich LDL of normal size, *J Biol Chem*, 269, 511-9.
79. TRIBBLE, D. L., HOLL, L. G., WOOD, P. D. & KRAUSS, R. M. (1992) Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size, *Atherosclerosis*, 93, 189-99.
80. TRIGATTI, B., RIGOTTI, A. & KRIEGER, M. (2000) The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism, *Curr Opin Lipidol*, 11, 123-31.
81. ČEŠKA, R. (2005) Hyperlipoproteinémie, dyslipidémie a jejich klasifikace, in: Češka, R. a kol. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*, pp. 61-74 (Praha, TRITON).
82. HUBÁČEK, J. A. & BOBKOVÁ, D. (2005) Molekulární genetika, lipidy a ateroskleróza, in: Češka, R. a kol. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*, pp. 75-92 (Praha, TRITON).
83. HUBACEK, J. A., BOBKOVA, D., BOHUSLAVOVA, R. & POLEDNE, R. (2008) Differences in expression of cholesterol 7alpha-hydroxylase between PHHC and Wistar rats, *Folia Biol (Praha)*, 54, 18-23.
84. BERARD, A. M., DABADIE, H., PALOS-PINTO, A., DUMON, M. F. & DARMON, M. (2004) Reduction of dietary saturated fatty acids correlates with increased plasma lecithin cholesterol acyltransferase activity in humans, *Eur J Clin Nutr*, 58, 881-7.

85. POLEDNE, R. (1986) Effect of diet on cholesterol metabolism in the Prague hereditary hypercholesterolemic rat, in: Beynen, A. C. (Ed.) *Nutritional effects on cholesterol metabolism*, pp. 91-7 (Voorthuizen, Transmondial).
86. LINDAHL, R. & EVCES, S. (1984) Rat liver aldehyde dehydrogenase. II. Isolation and characterization of four inducible isozymes, *J Biol Chem*, 259, 11991-6.
87. KOVAR, J., TONAR, Z., HECZKOVA, M., POLEDNE, R. (2009) Prague hereditary hypercholesterolemic (PHHC) rat - a model of polygenic hypercholesterolemia, *Physiol Res*, 58, S95-S99.
88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?db=gene>; (*ApoE* - 10. 7. 2008, *ApoF* - 15. 7. 2009, 30. 8. 2009).
89. <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> (*ApoE* - 12. 7. 2008, *ApoF* - 20. 7. 2009, 2. 9. 2009).
90. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (12. 7. 2008).
91. <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> (20. 7. 2009, 2. 9. 2009).
92. KASIM, S. E., LEBOEUF, R. C., KHILNANI, S. et al. (1992) Mechanisms of triglyceride-lowering effect of an HMG-CoA reductase inhibitor in a hypertriglyceridemic animal model, the Zucker obese rat, *J Lipid Res*, 33, 1-7.
93. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193, 265-75.
94. MACHOLÁN, L. *Přehled enzymové kinetiky* (1978) Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Přírodovědecká fakulta, Brno.
95. HAVEL, R. J., EDER, H. A. & BRAGDON, J. H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum, *J Clin Invest*, 34, 1345-53.
96. CARDONA-SANCLEMENTE, L. E., FEREZOU, J. & LUTTON, C. (1988) Cholesterol metabolism in the genetically hypercholesterolemic (RICO) rat. II. A study of plasma lipoproteins and effect of dietary cholesterol, *Biochim Biophys Acta*, 960, 382-9.
97. DELZENNE, N. M., CALDERON, P. B., TAPER, H. S. & ROBERFROID, M. B. (1992) Comparative hepatotoxicity of cholic acid, deoxycholic acid and lithocholic acid in the rat: in vivo and in vitro studies, *Toxicol Lett*, 61, 291-304.
98. FORGEZ, P. & WILLIAMS, D. L. (1990) Potential role of the exon 1 in the expression of human apolipoprotein E gene., *Circulation*, 82, 3-3.
99. RAISHER, B. D., MADORE, S. J. & WILLIAMS, D. L. (1994) Identification of Two Domains in the Non-translated Exon 1 of the Apolipoprotein E (ApoE) Gene Which Regulate Transcription., *Circulation*, 90, 402-402.
100. DEITRICH, R. A., BLUDEAU, P., STOCK, T. & ROPER, M. (1977) Induction of different rat liver supernatant aldehyde dehydrogenases by phenobarbital and tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *J Biol Chem*, 252, 6169-76.
101. DEITRICH, R. A., COLLINS, A. C. & ERWIN, V. G. (1972) Genetic influence upon phenobarbital-induced increase in rat liver supernatant aldehyde dehydrogenase activity, *J Biol Chem*, 247, 7232-6.
102. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q5M889>; (20. 4 2010).

9 POUŽITÉ ZKRATKY

ABC	adenosintrifosfát vážící kazety
ABCA	ATP-vážící kazety třídy A
ABCG	ATP-vážící kazety třídy G
Aldh	aldehyddehydrogenasa
ANOVA	analýza variance
ATP	adenosintrifosfát
Apo	apolipoprotein
bp	páry bází
cDNA	komplementární DNA
CETP	cholesteryl ester transfer protein (protein přenášející estery cholesterolu)
CR	remnanty chylomikronů
ddNTP	dideoxynukleotidy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidy
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EtBr	ethidium bromid
gDNA	genomová DNA
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HL	játerní lipasa
HLP	hyperlipoproteinémie
IDL	lipoproteiny o střední hustotě
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
LCAT	lecithin : cholesterolacyltransferasa
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LDLR	LDL receptor
LTIP	lipid transfer inhibitor protein (protein inhibující přenos lipidů)
LPL	lipoproteinová lipasa
LRP	LDL receptor related protein (protein příbuzný LDL receptoru)
MK	mastná kyselina
mRNA	mediátorová RNA
PCR	polymerasová řetězcová reakce
PHHC	Pražský hereditárně hypercholesterolemický
PLTP	phospholipid transfer protein (protein přenášející fosfolipidy)
RNA	ribonukleotidová kyselina
sdLDL	malé densní LDL
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v akrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírane sodného
SR	scavengerový receptor
SR-A	SR receptor třídy A
SR-B	SR receptor třídy B
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
TBE	Tris-borát-EDTA pufr
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> - tetramethylethylendiamin

TG	Triacylglyceroly
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
UC	ultracentrifugace
UV	ultrafialový
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
VLDLR	VLDL receptor