

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Specializace ve zdravotnictví

Zdravotnická technika a informatika



Bc. Petra Slámová

Kvantifikace genové exprese genu *Plzf* u potkaního modelu metabolického syndromu a hypertenze

Quantification of *Plzf* expression in a rat model of hypertension and metabolic syndrome

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce:

MuDr. František Liška Ph.D.

21. června
Praha, 2010

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repositáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

V Praze, 21.06.2010

Petra Slámová

Identifikační záznam:

SLÁMOVÁ, Petra, Kvantifikace genové exprese genu *Plzf* u potkaního modelu metabolického syndromu a hypertenze [Quantification of *Plzf* expression in a rat model of hypertension and metabolic syndrome] Praha 2009.89s., Diplomová práce (Mgr). Universita Karlova v Praze, 1.lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky. Vedoucí práce MuDr. František Liška Ph.D.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu MUDr. Františkovi Liškovi, PhD za čas který věnoval konzultacím k této diplomové práci a ing. Blance Chylíkové za její cenné rady a vedení při práci v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala celému týmu laborantek, bez jejichž vydatné pomoci by nebylo možné provést odběry u jednotlivých zvířat. A v neposlední řadě mé poděkování patří paní Zdeňce Kopecké, která prováděla genotypizaci.

Klíčová slova:

EN: Hypertension, metabolic syndrome, animal models, SHR (spontaneously hypertensive rat), Plzf (promyelotic leukemia zinc finger), gene expression, real-time RT-PCR, TaqMan chemistry

CZ: Hypertenze, metabolický syndrom, zvířecí modely, SHR (spontánně hypertenzní potkan), Plzf(promyelotic leukemia zinc finger), genová exprese, RT-PCR v reálném čase, technologie TaqMan

**Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
Kateřinská 32, Praha 2**

**Prohlášení zájemce o nahlédnutí
do závěrečné práce absolventa studijního programu
uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze**

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)	Signatura závěrečné práce	Datum	Podpis

Abstrakt

Významným zdrojem morbidity a mortality jsou lidská multifaktoriálně podmíněná onemocnění jako je hypertenze nebo metabolický syndrom. Metabolický syndrom je onemocnění charakterizované především rezistencí k účinkům inzulínu, poruchou metabolismu lipidů a sklony k hypertenzi a obezitě. Esenciální hypertenze, která je součástí metabolického syndromu, je velmi rozšířená po celém světě a představuje hlavní rizikový faktor pro srdeční choroby, selhání ledvin a mrtvici. K identifikaci genetické složky komplexních znaků se s výhodou používají inbrední kmeny zvířat. Jedním z nejvíce studovaných modelů metabolického syndromu a esenciální hypertenze je spontánně hypertenzní potkan (spontaneously hypertensive rat - SHR), který se ukázal být velmi cenným nástrojem pro studium fyziologických i farmakologických aspektů řízení krevního tlaku. V posledních desetiletích byl učiněn prokazatelný pokrok v genetickém mapování hypertenze a dalších kvantitativních znaků modelových kmenů potkanů, včetně SHR. Mnoho z těchto lokusů pro kvantitativní znaky (quantitative trait loci - QTLs) se podílí na patogenezi spontánní hypertenze s účinkem na změnu krevního tlaku, řádově o 10-20 mmHg. Jeden QTL podílející se na regulaci krevního tlaku se nachází na 8. chromosomu. To je doloženo kongenním kmenem SHR-Lx, u kterého je sekvence v tomto lokusu délky 788 kb, která obsahuje 7 genů, nahrazena sekvencí původu z kmene PD (s normálním tlakem) a dochází ke snížení krevního tlaku. Nadějným kandidátem na regulaci krevního tlaku a funkci srdce je gen *Plzf* (promyelotic leukemia zinc finger, také *Zbtb16*) nacházející se v tomto lokusu. Sekvenční analýza genu *Plzf* odhalila polymorfismus jednoho nukleotidu (single nucleotide polymorphism - SNP) vedoucí k substituci threoninu za serin u kmene SHR v aminokyselinové pozici 208 (T208S) a delecí potenciální regulační sekvence v intronu 2 genu *Plzf* u kmene SHR-Lx. Tato delece může mít za následek diferenciální expresi *Plzf* u kmene SHR ve srovnání s SHR-Lx. U kongenního kmene SHR-Lx, u kmene SHR a u heterozygotního potkana (jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx) jsem provedla stanovení exprese *Plzf* pomocí metody real-time RT-PCR, což je metoda umožňující přesnou kvantifikaci hledané cDNA sekvence ve vzorku. K reakci jsem použila orgány od potkanů starých jeden a čtyři dny. Mladé potkany jsem zkoumala, protože jsme chtěli

odfiltrovat vlivy prostředí a faktory životosprávy např. sekundární vliv hypertenze na srdce. V průběhu práce jsem odhalila významné rozdíly v expresi *Plzf* u SHR. U potkanů starých jeden den je patrná vyšší exprese u srdce, ledvin, nadledvin a tuku u kmene SHR oproti kmeni SHR-Lx. Heterozygoti mají střední úroveň exprese (aditivní účinek alely SHR). U potkanů starých čtyři dny je výsledek opačný. U všech zkoumaných orgánů – u srdce, jater, ledvin, nadledvin, tuku a svalů, je snížená exprese u SHR, oproti stejně vysoké úrovni exprese u SHR-Lx a heterozygotů (dominantní účinek alely SHR-Lx). Zjištěný rozdíl může být podkladem fenotypového rozdílu, je však nutné toto tvrzení funkčně ověřit, např. pomocí transgenních potkanů.

Abstract

Multifactorial diseases like hypertension or metabolic syndrome are significant causes of morbidity and mortality. The metabolic syndrome is mostly characterized by resistance to insulin effect, impairment of lipid metabolism and inclination to hypertension and obesity. Essential hypertension which is the part of the metabolic syndrome is widely spread all over the world and presents the main risk factor for coronary diseases, kidney failure, and stroke. Inbred animal models can be used for identification of the genetic component of complex diseases. The most studied model of metabolic syndrome and essential hypertension is the spontaneously hypertensive rat (SHR), which has proven to be a valuable tool for studying the pharmacological and physiological aspects of blood pressure regulation. There has been significant progress during the last decades in genetic mapping of hypertension and other complex traits in rat models, including SHR. Many of these quantitative trait loci – QTLs are involved in pathogenesis of spontaneous hypertension with the effect on the blood pressure variation about 10-20 mmHg. One QTL involved in blood pressure regulation is located on the rat 8th chromosome. This QTL has been confirmed by the congenic strain SHR-Lx. In this strain the 7-gene 788 kb segment of chromosome 8 of SHR origin has been substituted by the sequence of PD origin (inbred strain PD has normal blood pressure). SHR-Lx showed significant decrease of blood pressure and heart weight compared to SHR. Promising candidate gene for blood pressure

regulation and heart function is *Plzf* (promyelotic leukemia zinc finger, also *Zbtb16*) which is located in this locus. Analysis of *Plzf* gene sequence revealed a SNP (single nucleotide polymorphism) leading to aminoacid substitution (T208S). SHR has the serine allele, while SHR-Lx has the threonine allele. Moreover there is a deletion of a potential regulatory sequence in intron 2 in SHR-Lx which may result in differential expression of *Plzf* in SHR and SHR-Lx. I measured the expression of *Plzf* in SHR, SHR-Lx and heterozygotes using real – time RT-PCR with TaqMan probes. This is a method allowing precise quantification of the cDNA of choice in the sample. I used the organs from rats one and four days old. We examined the young rats because we wanted to eliminate the environmental and lifestyle effects, e.g. the (secondary) impact of hypertension on the heart. During my work I have detected significant differences in expression of *Plzf* in SHR. There is higher expression of the heart, kidneys, adrenal glands and fat in one day old SHR rats compared to SHR-Lx. The heterozygotes show intermediate expression level in the heart (additive effect of the SHR allele). In four days old rats I demonstrated the opposite result. For all assayed organs - heart, liver, kidney, adrenal gland, fat and muscle, there is a decrease of *Plzf* expression in SHR compared to both SHR-Lx and heterozygotes. Similar expression level in SHR-Lx and heterozygotes suggests dominant effect of the SHR-Lx allele. The observed difference can form the basis of the phenotype difference between SHR and SHR-Lx. However, it is necessary to verify this prediction functionally, for example by creating *Plzf* transgenic rats.

Obsah

ÚVOD	10
METABOLICKÝ SYNDROM A HYPERTENZE.....	10
MODELOVÉ ORGANISMY VYUŽITÉ V TÉTO PRÁCI.....	12
PLZF.....	15
METODIKA	18
ZÍSKÁNÍ VZORKU.....	18
GENOTYPIZACE.....	18
<i>Izolace DNA</i>	18
<i>PCR - Polymerasová řetězová reakce</i>	19
<i>Elektroforéza</i>	22
<i>Výběr vzorků pro expresi</i>	23
STANOVENÍ EXPRESE.....	24
<i>Izolace RNA</i>	24
<i>Reverzní transkripce</i>	27
<i>Real-time PCR</i>	29
<i>Real-time PCR amplifikace</i>	33
<i>Nanesení reakčních mixů na destičku</i>	34
<i>Amplifikační procedura</i>	35
STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	36
VÝSLEDKY	37
1. DEN.....	38
<i>Srdce</i>	38
<i>Játra</i>	41
<i>Ledviny</i>	44
<i>Nadledviny</i>	47
<i>Tuk</i>	50
<i>Sval</i>	53
4. DEN.....	56
<i>Srdce</i>	56
<i>Játra</i>	59
<i>Ledviny</i>	62
<i>Nadledviny</i>	65
<i>Sval</i>	71
DISKUSE.....	74
ZÁVĚR	75
POUŽITÁ LITERATURA	77
PŘÍLOHY	80

Úvod

Genetická výbava člověka podmiňuje nejen jeho fyziologické znaky, ale obsahuje také předpoklady pro vznik mnoha onemocnění. Nejčastěji jsou v této souvislosti připomínána zhoubná nádorová onemocnění, ale také hypertenze nebo metabolický syndrom. Moderní metody analýzy DNA a na jejich základě získané poznatky o struktuře a funkci lidského genomu nám nyní umožňují rozšifrovat molekulárně genetickou podstatu nejen monogenních, ale i multifaktoriálně podmíněných znaků, tj. najít geny, které jsou za tyto znaky zodpovědné.

Lze říci, že lidská multifaktoriálně podmíněná onemocnění představují významný zdroj morbidity a mortality, i značnou ekonomickou zátěž. Dědičná složka těchto onemocnění je však nesmírně komplexní a hledání zodpovědných genů nadmíru složité [1]. Proto lze s výhodou využít definovaných modelových organismů. Takto získané výsledky mohou být významným přínosem pro studium odpovídajících lidských onemocnění, vzhledem k vysokému stupni homologie architektury genomu i fyziologických procesů u savců.

Metabolický syndrom a hypertenze

Metabolický syndrom (též někdy známý jako Reavenův syndrom, syndrom X či syndrom inzulínové rezistence), je onemocnění charakterizované především rezistencí k účinkům inzulínu, poruchou metabolismu lipidů a sklony k hypertenzi a obezitě. Syndrom je provázen závažnými zdravotními problémy – např. infarkty myokardu, mozkovými mrtvicemi či cévními komplikacemi. Typickým znakem metabolického syndromu je nadbytek tukové tkáně v oblasti pasu (centrální obezita). Tato tkáň je méně citlivá k hormonu inzulínu, jehož hladina stoupá a vede k zadržování tekutin v těle a ke vzestupu krevního tlaku. Současně se z této tkáně více uvolňují mastné kyseliny, které způsobují růst hladiny krevních tuků, triacylglycerolů. Právě vyšší krevní tlak a vyšší hladina krevních tuků vedou k poškozování tepen zásobujících srdce a mozek. V určitém okamžiku nestačí už ani vyšší hladiny inzulínu a v krvi začne stoupat hladina krevních cukrů, což je jeden z příznaků diabetu mellitu a další faktor přímo poškozující naše cévy. Při vzniku syndromu hraje roli dědičná

dispozice a faktory životosprávy, k nimž patří přejídání, nedostatek fyzického pohybu, alkohol, kouření a obezita.

Esenciální hypertenze je velmi rozšířená po celém světě a představuje hlavní rizikový faktor pro srdeční choroby, selhání ledvin a mrtvici [2]. Nicméně, molekulárně genetický základ esenciální hypertenze zůstává do značné míry neznámý [3, 4]. Odhalení genů odpovědných za esenciální hypertenzi je ve srovnání s jinými komplexními onemocněními náročné, zejména vzhledem k tomu, že výsledky nebyly dosud nezávisle potvrzeny celogenomovou asociační studií (genome-wide association analysis - GWAS). Respektive při srovnávání různých GWAS nedochází k průniku výsledků. K identifikaci genů komplexních kardiovaskulárních znaků se proto s výhodou používají inbrední kmeny zvířat [5]. Nejvíce studovaným modelem esenciální hypertenze a metabolického syndromu je spontánně hypertenzní potkan (SHR), který se ukázal být velmi cenným nástrojem pro studium farmakologických a fyziologických aspektů řízení krevního tlaku. Proto je také intenzivní zájem o objevení základních mechanismů, které jsou základem patogeneze hypertenze a souvisejících kardiovaskulárních a metabolických poruch u SHR. V posledních desetiletích byl učiněn prokazatelný pokrok při mapování lokusů pro kvantitativní znaky (quantitative trait loci - QTL) spojených s regulací krevního tlaku a dalšími znaky u různých hypertenzních kmenů potkanů, včetně SHR [6, 7]. Takové QTL představují poměrně velké oblasti chromozomu (až desítky miliónů párů bází) a obvykle obsahují mnoho genů. Mnohé z těchto QTL se podílejí na patogenezi spontánní hypertenze s účinkem na změnu krevního tlaku, řádově o 10-20 mmHg. Nicméně, mnohem menší pokrok byl učiněn při identifikaci specifických genů pro kvantitativní geny (quantitative trait genes - QTG) odpovědných za účinky těchto oblastí chromozomu, na krevní tlak. Přes více než 40 let výzkumu, se vědcům podařilo identifikovat pouze jedno genetické poškození, a to deleční mutaci CD36, která se u SHR podílí na zvýšení krevního tlaku.

Modelové organismy využité v této práci

K izolaci jednotlivých komponent metabolického syndromu byly použity kongenní kmeny, tedy takové kmeny, u kterých je na genetické pozadí kmene jednoho vnášen předem zvolený omezený segment genomu kmene druhého. Předmětem mojí práce byly modely hypertenze a metabolického syndromu u laboratorního potkana SHR, SHR-Lx a heterozygotního potkana. SHR (spontánně hypertenzní potkan) je model metabolického syndromu a hypertenze. Kongenní kmen SHR-Lx byl vytvořen přenesením 30 cM dlouhé oblasti potkaního chromosomu 8, smíšeného původu od kmene PD a BN na genetické pozadí kmene SHR. Heterozygotní potkan má jednu kopii 8. chromosomu původu SHR a druhou kopii původem od kmene PD.

Ve srovnání s progenitorovým kmenem SHR bylo u SHR-Lx zjištěno snížení krevního tlaku za současného zhoršení několika metabolických parametrů souvisejících s metabolickým syndromem [8, 9]. V rámci procesu identifikace zodpovědných genů/alel je diferenciální úsek kongenního kmene, cíleným křížením postupně omezován při zachovaném efektu na sledovaný fenotyp. S použitím výchozího kmene SHR-Lx bylo vytvořeno několik kongenních podlinií. Sublinie SHR-Lx-PD5 obsahuje přibližně 788 kb sekvence původu pouze od kmene PD, zahrnující pouze 7 genů. Zbytek genomu tohoto kmene je původu SHR [10] (Viz. obr. 1). Moje práce se týká výhradně podlinie SHR-Lx-PD5.

Kmen PD/Cub má mutovanou alelu genu *Lx*, projevující se syndromem polydaktylie-luxace. Tento inbrední kmen je na ústavu ÚBLG 1.LF a VFN chován již od roku 1969, přičemž původně sloužil jako modelový organizmus pro studie zabývající se vývojem končetin a teratogenezí. Nicméně v devadesátých letech minulého století bylo zjištěno, že jednou z vlastností kmene je i zvýšená hladina triacylglycerolů [11]. Počátkem tohoto století pak byl kmen PD/Cub ustanoven jako model metabolického syndromu [12].

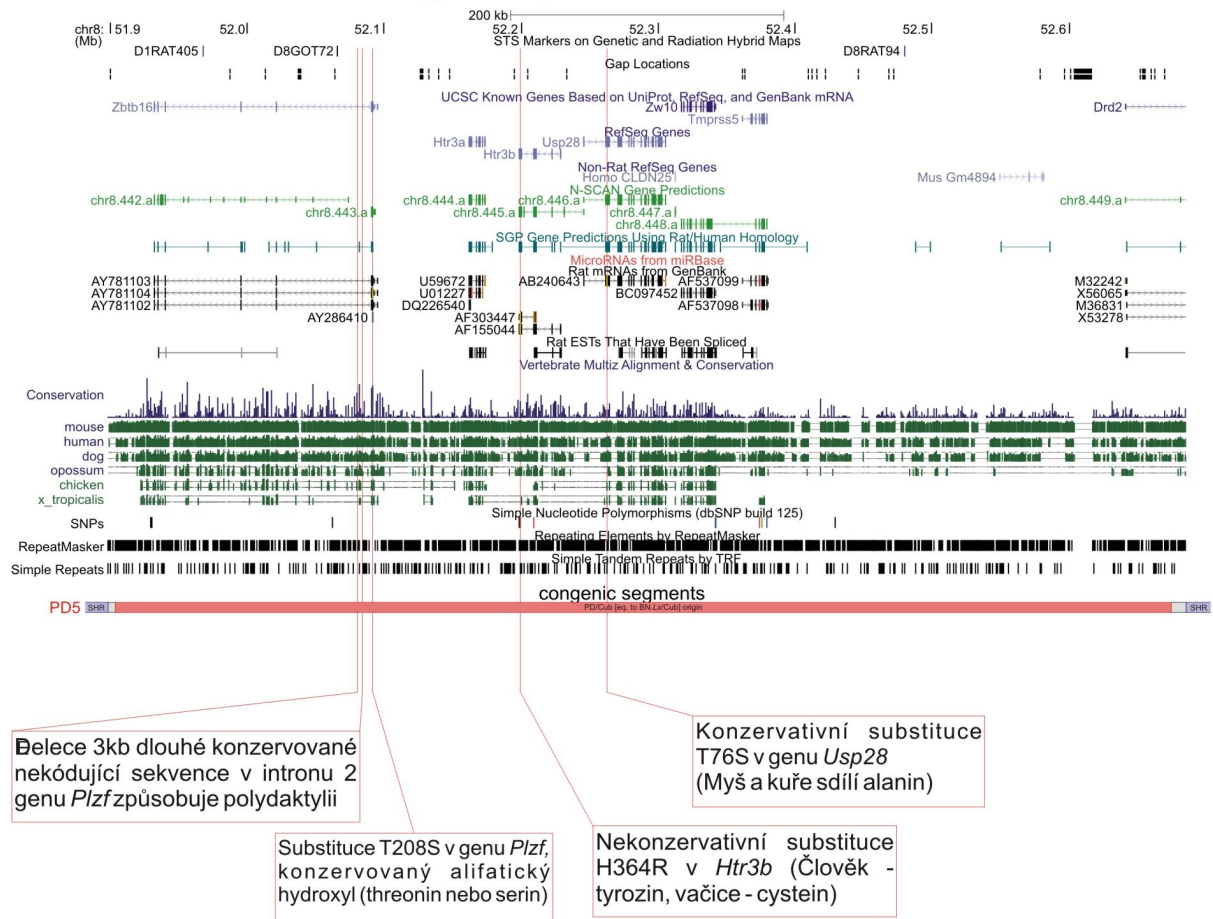
Ze srovnání metabolických a morfometrických dat a profilů genové exprese mezi kmeny SHR-Lx PD5 a SHR vyplynulo, že několik zřetelných metabolických poruch pozorovaných v původním kongenním kmeni SHR-Lx je v PD5 stále přítomno. Také je nadále snížena hodnota krevního tlaku. Dá se tedy předpokládat, že zodpovědné genomické determinanty byly "zachyceny" uvnitř relativně krátkého

diferenciálního segmentu původu PD/Cub. Nejvýznamnějším parametrem je pravděpodobně značné snížení inzulínové senzitivity kosterního svalu u kmene SHR-Lx-PD5.

Jedním z kandidátních genů je *Plzf* (promyelotic leukaemia zinc finger, také *Zbtb16*), jehož změněná regulace je s největší pravděpodobností rovněž zodpovědná za mutaci Lx [13]. Protein Plzf je represor transkripce s širokým uplatněním v regulaci různorodých procesů. Mezi sedmi protein-kódujícími geny v diferenciálním segmentu kmene PD5 se nacházejí další geny *Htr3a* a *Htr3b*, kódující podjednotky serotoninového receptoru 5-HT3. *Htr3a* je kandidátním genem pro schizofrenii [14], 5-HT3 receptory se podílí na zprostředkování neusey (vyvolání zvracení) např. při nádorové chemoterapii, dále při patogenezi syndromu dráždivého tračníku [15], mutace 5-HT3 receptorů se mohou podílet na patogenezi Touretova syndromu [16]. Role *Htr3a* a *Htr3b* při patogenezi metabolického syndromu není dosud popsána, nicméně společně s cholecystokininem mají zásadní roli v regulaci příjmu potravy [17, 18] a centrální 5-HT3 receptory se podílejí na regulaci glykémie [19].

Výsledky studií [10] poukazují na významné zlepšení krevního tlaku a srdeční hypertrofie u podlinie SHR-Lx-PD5 ve srovnání s SHR kontrolami. PD5 kongenní podlinie také vykazuje značné zlepšení srdeční hypertrofie, kdy relativní hmotnosti srdce jsou podstatně nižší ve srovnání s SHR kontrolami.

Kongenní podlinie SHR-Lx-PD5



Obr.č.1 – Převzato z - *Dissection of the role of Plzf gene in hypertension and metabolic syndrome*, Krupková M. Tento diferenciální segment v SHR-Lx PD5 je dlouhý 788kb a obsahuje 7 genů - *Plzf*, *Htr3a*, *Htr3b*, *Usp28*, *Zw10*, *Tmprss5*, a fragment *Drd2*. Pro tuto práci je nejvýznamnější variabilita v 2.intronu *Plzf* genu, kde byla objevena delece; a substituce threoninu za serin v aminokyselinové pozici 208 (T208S).

Plzf

Plzf (promyelotic leukemia zinc finger, také Zbtb16 nebo Zfp145) byl původně objeven u člověka, prostřednictvím genové fúze s RAR α lokusem translokace t(11;17) (q23;q21) [20]. Tato genová fúze, způsobuje vzácnou formu promyelocytární leukemie, rezistentní k léčbě kyselinou retinovou. Protein Plzf je represor transkripce s širokým uplatněním v regulaci různorodých procesů, vč. metabolismu [21]. Plzf také interaguje s jadernými receptory, a to zejména s receptorem kyseliny retinové RAR α blokující RAR-RXR heterodimerizaci nezbytné pro signalizaci kyseliny retinové [22.] Plzf má souvislost s mnoha různými vývojovými, fyziologickými a patologickými procesy. Narušení funkce Plzf pomocí genového targetingu, nebo spontánní bodové mutace vede k mnohonásobným poruchám stavby končetiny, k preaxiální polydaktylii [23] a mužské neplodnosti v důsledku nedostatku obnovování spermatogenních kmenových buněk [24, 25].

Kongenní segment původu PD obsahuje mutaci Lx, způsobující polydaktylii u PD, stejně jako u kongenních kmenů BN-Lx a SHR-Lx včetně podlinie PD5. Nedávno byla jako pravděpodobná příčina polydaktylie (alela Lx) identifikována 3 kb delece v intronu 2 genu *Plzf* [13].

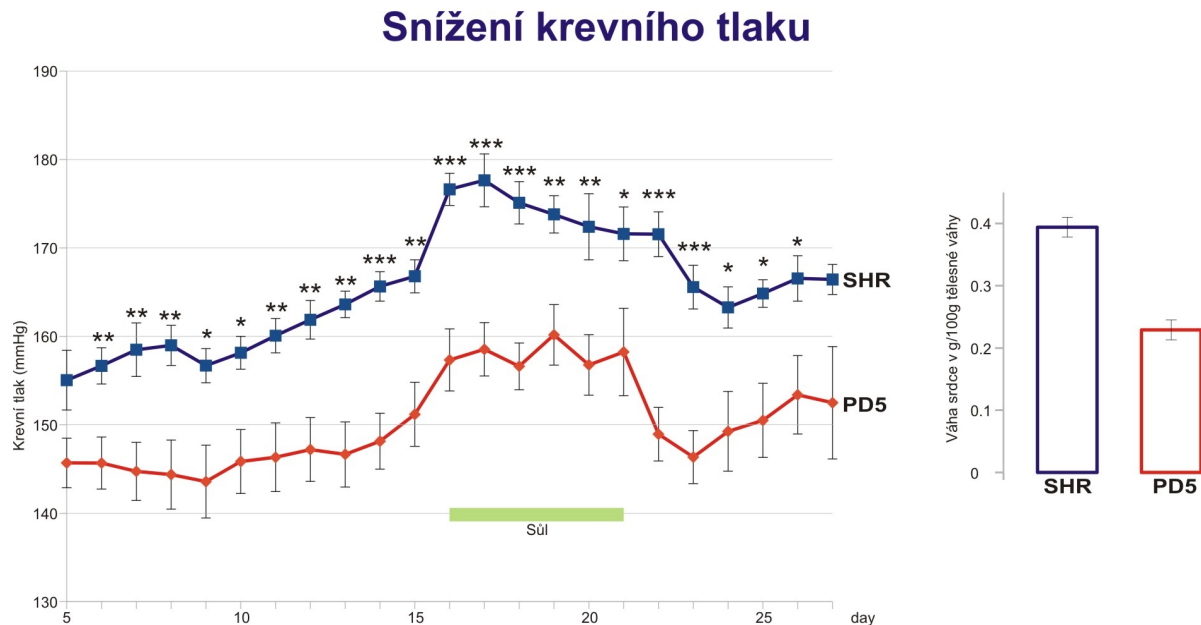
Několik různých dokladů poukazuje na možné zapojení Plzf v patogenezi hypertenze, případně srdeční hypertrofie.

1. Plzf je součástí negativní zpětné vazby při regulaci účinku mineralokortikoidů v renálních epitelových buňkách. Aldosteron indukuje expresi Plzf. Plzf potlačuje expresi beta a gama epiteliálních sodíkových kanálů (ENaC) a tím snižuje resorpci sodíku [26].

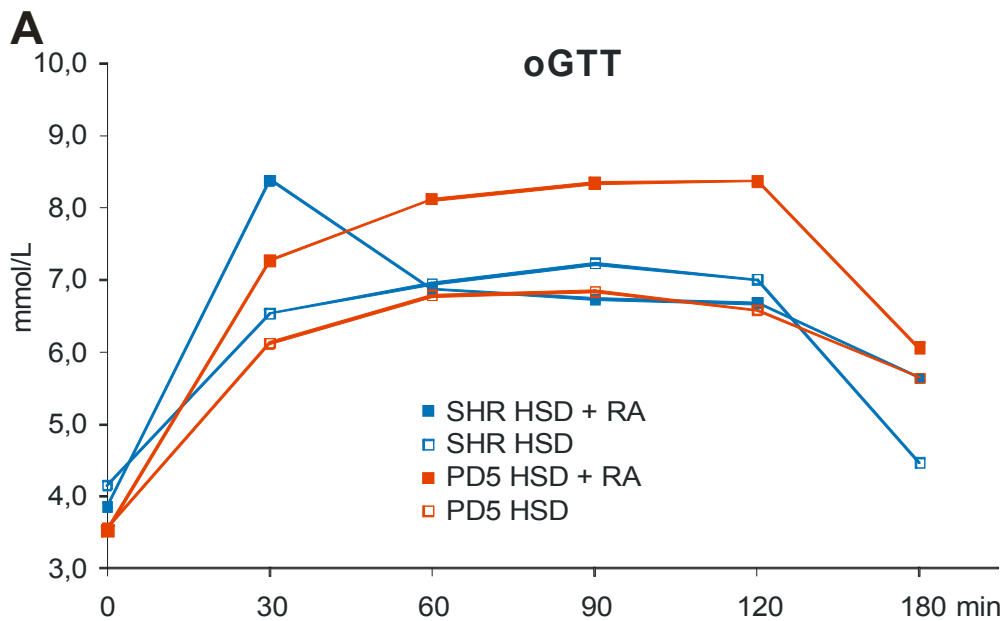
2. Přímá interakce Plzf s angiotenzinovým receptorem AT2 ovlivňuje expresi p85 α PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase p85 α subunit). Tato dráha může vysvětlit chybějící zvýšenou srdeční reakci u myši s chybějícím AT2[27.]

3. Přímá interakce Plzf s reninovým receptorem vede ke zvýšené expresi p85 α PI3K. Navíc, stimulace reninu má proliferační a antiapoptotické účinky na kardiomyocyty potkana. Tyto účinky jsou zcela závislé na funkci Plzf. To může být spojeno se srdeční hypertrofií, nebo s fibrózou související s hypertenzí [28].

Sekvenováním alel genu *Plzf* bylo zjištěno, že kmen SHR nese unikátní substituci aminokyseliny v genu *Plzf*, která se nachází pouze v SHR a příbuzných kmenech [10]. Kromě toho, kongenní kmeny nesou delecii v konzervované nekódující sekvenci v intronu *Plzf*, která vede k snížení exprese *Plzf* v končetinových pupenech a k polydaktylii [13].



Obr.č.2 - Převzato z - *Dissection of the role of Plzf gene in hypertension and metabolic syndrome*, Krupková M. A) Radiotelemetrické měření systolického krevního tlaku (24 hodinové průměry). SHR (modrá) a PD5 (červená). Opakované měření zpracováno ANOVA testem, hladina významnosti * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. B) Váha srdce byla normalizovaná na 100g tělesné váhy. Zpracováno T-testem hladina významnosti $p = 3,85 \times 10^{-6}$.



Obr.č.3 - Převzato z - *Dissection of the role of Plzf gene in hypertension and metabolic syndrome*, Krupková M. Orální glukozový toleranční test u SHR (modrá) a PD5(červená) s (plné čtverečky) a nebo bez (otevřené čtverečky) řízení kys.retinové. Potkani byly krmeni stravou bohatou na sacharózu (60% energie jako sacharóza). Polovina potkanů dostávala retinovou kyselinu (15 mg/kg, 16 dní) Hodnoceno pomocí analýzy rozptylu dvojitého třídění (two-way ANOVA). Hladina významnosti p kmene = 0,0006, hladina významnosti pro RA p = 0,00001, hladina významnosti pro interakci faktorů kmen a RA = 0,04.

Metodika

Získání vzorku

Pokus na zvířatech proběhl v rámci grantu GAČR 301/10/0756. Projekt pokusů byl schválen odbornou komisí uživatelského zařízení 1. lékařské fakulty a proběhl v souladu s platnou legislativou (zákon 311/1997 a navazující právní předpisy).

Cílem pokusu bylo sledovat vývoj exprese genu *Plzf*. Pro tento pokus byli použiti 1 a 4 dny staří potkani. U každého potkana jsme nejprve stanovili tělesnou hmotnost, poté jsme je usmrtili zlomením vazy s následnou dekapitací. Odebrali jsme potřebné orgány, a to - srdce, játra, ledviny, nadledviny, sval z dolní končetiny a hnědý tuk ze zad potkana. U každého potkana byl také odebírán ocásek, který se následně použil k určení genotypu. Všechny odebrané orgány jsme také zvážili a hodnoty zaznamenali do tabulky (viz příloha č.1). Všechny orgány byly homogenizovány v množství 0,05mg na 1 ml trizolu (R) (Invitrogen) a okamžitě zmraženy při -70°C.

Genotypizace

Izolace DNA

K určení genotypu jednotlivých zvířat, jsme provedli izolaci DNA z potkaních ocásků. U každého jedince bylo odebráno asi 0,5 cm tkáně, která se nastříhala na malé kousky a zalila trávícím pufrům (50mM Tris HCl pH 8, 50 mM EDTA, 0,5% SDS), který se připravuje v laboratoři. Po přidání 35 µl proteinázy K (Sigma) byly vzorky umístěny do vodní lázně zahřáté na 55 °C, kde se přes noc nechaly inkubovat. Druhý den jsme ke vzorku přidali 700 µl směsi fenol - chloroform - isoamylalkohol (25:24:1) a centrifugovali po dobu 3 minut, při 9 000 otáčkách. Odebrali jsme supernatant a krok ještě jednou zopakovali. Do zkumavky jsme napipetovali 70 µl 3M octanu sodného a po pár minutách jsme přidali 700 µl 96% ethanolu. V této fázi se začínala srážet DNA. Vyizolovanou peletu jsme 2x promývali v 1 ml 70% ethanolu a následně nechali vzorek rozpouštět v 150 - 200 µl v pufru TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0). U takto připraveného materiálu je nyní možné provést PCR.

PCR - Polymerasová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction - PCR) je metoda rychlé a snadné amplifikace úseků DNA založená na principu replikace nukleových kyselin. Umožňuje amplifikaci DNA fragmentů až do velikosti 30000 párů bází, běžně se však používá amplifikace úseků DNA o velikosti jen 100 – 600 pb. Reakce vychází ze znalosti kinetiky denaturace a opětovné renaturace molekul DNA. Při teplotě 92°C je dvojšroubovice DNA kompletně denaturována a v reakční směsi se vyskytuje výhradně v jednořetězové formě. Při poklesu teploty dochází díky vzájemné komplementaritě řetězců k opětovné renaturaci molekuly.

Pomocí polymerázové řetězové reakce lze však namnožit jen takové fragmenty, které jsou alespoň ohraničeny úseky o známé sekvenci, pokud jejich sekvence není známa kompletně. Podle těchto sekvencí jsou potom navrhovány tzv. primery, tj. jednořetězové molekuly DNA o délce 20 - 25 párů bází. Důležité je, aby cílové sekvence s nimiž primery hybridizují, byly specifické jen pro vyšetřovanou oblast a nevyskytovaly se na jiných místech genomu. Tyto oligonukleotidy jsou syntetizovány uměle a jsou nezbytnou součástí reakční směsi, stejně tak jako jednotlivé deoxynukleotidfosfáty (dNTP), vhodný reakční pufr a termostabilní enzym - Taq DNA polymeraza. PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler, které je zkonstruováno tak, aby dokázalo během několika sekund zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek stupňů Celsia. PCR reakce sestává ze tří základních kroků, a to z denaturace, annealingu a elongace.

1) Denaturace

V prvním kroku reakce dochází při teplotě zhruba 92 – 98 °C k denaturaci dvojšroubovice templátové DNA. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice. Vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou mohou v dalším kroku nasednout primery.

2) Annealing

V druhém kroku je teplota snížena a primery přítomné v reakční směsi mohou vyhledat komplementární úseky cílové DNA a vytvořit s nimi dvojšroubovici. Tato část reakce bývá označována jako annealing nebo hybridizace primerů. Teplotu annealingu je možné teoreticky vypočítat na základě znalosti sekvence primerů,

prakticky je však nutné optimální teplotu pro každou dvojici primerů hledat experimentálně. Probíhá při teplotě 45 – 65 °C.

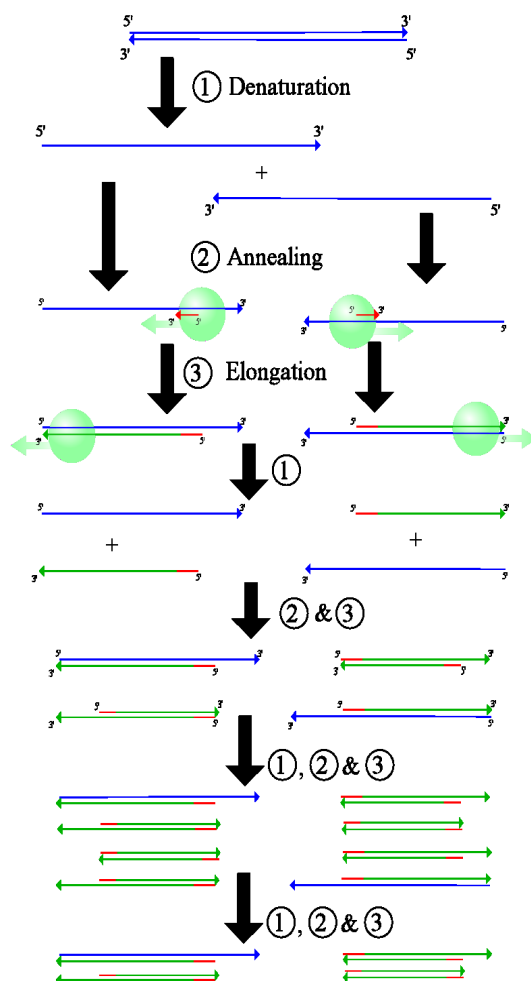
3) Elongace

Třetí krok reakce začíná při teplotě 72 °C a dochází při ní k prodlužování, neboli elongaci nukleotidových řetězců, působením Taq DNA polymerázy. Přítomnost krátkých dvojřetězových úseků s volným 5'- koncem je předpokladem pro činnost tohoto enzymu, který nasedne na konec primerů a začne dosyntetizovávat druhé komplementární vlákno dvojšroubovice. Enzym Taq polymerázy byl izolován z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* a je tudíž schopen pracovat optimálně při teplotách kolem 72 °C.

Uvedené kroky představují pouze první cyklus PCR, jenž by sám o sobě k namnožení zkoumaného úseku DNA nestačil. Teprve ve třetím cyklu se vytvářejí dvojřetězové fragmenty DNA o délce odpovídající amplifikovanému úseku. Templátová vlákna vznikají denurací původně dvouvláknové DNA. Primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci, takže po jednom cyklu PCR vznikají produkty, které slouží jako templáty pro nový reakční cyklus. Máme-li tedy na začátku k dispozici dvě templátová vlákna (jednu dvojvláknovou molekulu), pak vzniknou v prvním cyklu dvě kopie. Pro další cyklus máme k dispozici už čtyři vlákna, podle kterých vzniknou další 4 kopie. Teoreticky se množství úseků každým cyklem zdvojnásobuje. V praxi však výtěžnost amplifikační reakce bývá nižší. Aby se jich vytvořilo dostatečné množství, opakují se tři reakční kroky - denaturace, annealing a elongace ve dvaceti až čtyřiceti na sebe navazujících cyklech.

V závěru PCR získáme směs obsahující velké množství amplifikovaných fragmentů. Aby je bylo možno použít pro další vyšetření, musíme je oddělit od zbytku DNA. Pro analýzu produktu reakce je nejspolehlivější metodou elektroforéza, která umožňuje nejen určit, zda došlo k amplifikaci, ale také zda se jedná o předpokládanou délku fragmentu.

K výhodám reakce patří potřeba minimálního množství výchozí DNA, rychlost a vysoká specifita. Z charakteru reakce vyplývají její nevýhody, především její náchylnost ke kontaminaci cizorodou DNA, vedoucí k falešné pozitivitě. S ohledem na možnost kontaminace vzorků produkty amplifikačních reakcí probíhá izolace DNA a příprava reakčních směsí v prostoru odděleném od laboratoře, v níž jsou amplifikáty analyzovány.



Obr.č.4 - Schéma Polymerázové řetězové reakce (PCR). Převzato z wikipedia.org

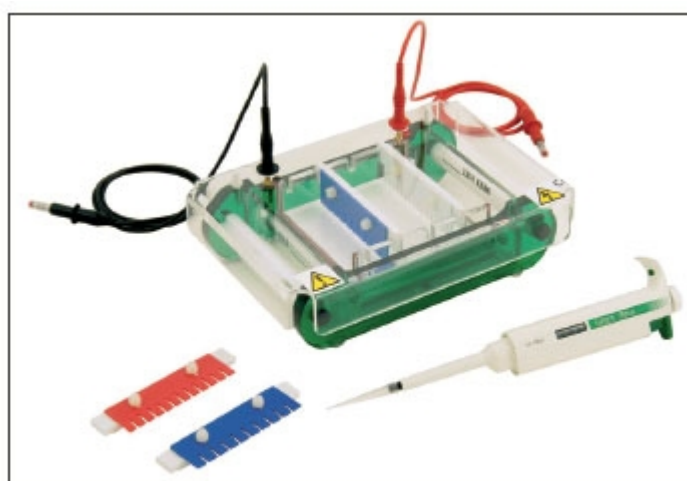
PCR amplifikace byla provedena za následujících podmínek:

Primární denaturace	94°C	2 min	30 cyklů
Denaturační krok	92 °C	30 s	
Annealing	55 °C	35 s	
Elongace	72°C	45 s	
Konečná elongace	72°C	5 min	

Tabulka č.1 – receptura PCR

Elektroforéza

Nejspolehlivějším způsobem detekce je gelová elektroforéza. Tato metoda je založená na izolaci molekul o rozdílné hmotnosti, popř. odlišném elektrickém náboji. Roztok obsahující fragmenty DNA převádíme do jamek v tzv. elektroforetickém gelu. Vytvoříme jej rozpuštěním polysacharidu zvaného agaróza v horké vodě. Tento hustý koloidní roztok pak nalijeme na povrch elektroforetické desky a necháme ochladit. Vytvoří se rosolovitá vrstva podobná aspiku. V některých případech se místo agarózy používají jiné polymerní látky, např. polyakrylamid. Elektroforetickou desku pak umístíme do zvláštní aparatury, která je připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Z jamek na okraji elektroforetického gelu jsou pak záporně nabitě fragmenty DNA přitahovány ke kladné elektrodě, neboť na jeden nukleotid připadá 1 záporný náboj zbytku kyseliny fosforečné. Pokud se vytvoří fragmenty o rozdílné délce (reprezentující dvě různé alely), dojde na elektroforetickém gelu k jejich oddělení, takže jej můžeme spolehlivě rozlišit. Kratší úseky DNA procházejí elektroforetickým gelem rychleji než delší úseky, proto je nalzáme ve větší vzdálenosti od výchozí jamky. Fragmenty v gelu zviditelníme přidáním fluorescenčního barviva, obvykle ethidium-bromidu, které se váže specificky na DNA a v ultrafialovém světle jasně září. Elektroforeticky se rovněž ověří velikost získaného fragmentu, která je daná lokalizací primerů a lze ji tedy předem zjistit na základě znalosti sekvence DNA. Je-li výsledkem reakce fragment odlišné velikosti, je potřeba reakci dále optimalizovat.



Mini plus

Obr.č.5 – elektroforéza. Převzato z Fisher Scientific - www.thermofisher.cz

Příprava agarosy:

Agarosa	1,5%	2%
Agarosa	1,2 g	1,6 g
dostilovaná voda	64 ml	64 ml
TBE pufr	16 ml	16 ml

Tabulka č.2 – receptura přípravy agarosy

Odměřené suroviny jsem důkladně promíchala a přivedla k varu. Do horkého roztoku jsem připipetovala 1 μ l etidium - bromidu a nechala zchladit pod tekoucí vodou na 60°C. Pak jsem vše nalila do elektroforetické vany a nechala tuhnout 30 minut při pokojové teplotě. Ztuhlý gel jsem zalila 5x zředěným TBE pufrem. Do vytvořených jamek jsem nanášela vzorky o objemu 5 μ l. Poté jsem spustila elektroforézu při elektrickém napětí 85V, a nechala jsem běžet 15 až 35 minut. Produkt jsem detekovala pod UV lampou.

Výběr vzorků pro expresi

Do pokusu byly zahrnuti potkani s třemi různými genotypy SHR (spontánně hypertenzní potkan), PD/Cub (polydaktylní potkan) a heterozygotní potkan. Vybrala jsem 7 potkanů od každého genotypu, který jsem zjistila z izolace DNA potkaních ocásků. Při výběru jsem dbala na to, aby hmotnosti jednotlivých zvířat byly srovnatelné. Dalším kritériem pro výběr vzorku byla hmotnost zpracovávaných orgánů (viz příloha č.2 a č.3). Z důvodů minimalizace chyby jsem zvolila pro odběr všech orgánů pouze jedno zvíře. U takto vybraných vzorků jsem provedla izolaci RNA. Hlavním kritériem pro další zpracování byla naměřená čistota RNA, která se určuje poměrem mezi hodnotami absorbance při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) a neměla by klesnout pod 1,6.

Stanovení exprese

Izolace RNA

Hlavním úskalím práce s RNA je její citlivost na degradaci všudypřítomnými, vysoce stabilními RNázami. Proto je nutné všechny kroky provádět v rukavicích, smí se používat pouze materiál a chemikálie prosté RNáz. Veškeré sklo musí být pečené 2 hodiny při 250°C, plasty pouze vyjmuté z originálního balení v rukavicích a předsterilizované minimálně 20 minut při 121°C. Voda je ošetřena DEPC – diethylpyrokarbonátem.

Dalším důležitým krokem pro úspěšnost reakce je izolace kvalitní RNA v dostačující kvantitě a kvalitě. Před započítím práce je nutné nejprve stůl důkladně otřít RNA free vodou. Poté je možno započít s izolací a vyjmout vzorky, které byly odebrány do 1ml trizolu, z mrazáku. Necháme vzorky rozmraznout při pokojové teplotě a následně stočíme v centrifuze chlazené na 4°C. Točíme 20 minut při maximálních otáčkách (20 000 otáček).

Připravíme si 4 sady sterilních zkumavek. První dvě sady zkumavek jsou 1,5 ml velké a slouží pouze k přelití produktu, nebudou se nadále uchovávat. Třetí sada je tvořena speciálními kolonkovými zkumavkami s filtrem s obsahem SiO₂, uzpůsobeným k záchytu RNA produktu. Ve čtvrté sadě zkumavek se uchovává finální produkt, tedy vyizolovaná RNA. Je proto nutné, aby všechny zkumavky byly dobře a čitelně popsány, se všemi náležitostmi, a to jak na víčku tak i na těle zkumavky.

Vlastní postup práce:

1. Po rozmražení vzorku, centrifugujeme 10 minut při 20 000 otáčkách a 4°C.
2. Vzorek přelijeme do 1.sady zkumavek a přidáme 200 ml chloroformu.
3. Zkumavky vložíme na 10 minut na kolotoč, kde se reagentie důkladně promíchají.
4. Centrifugujeme 10 minut při 20 000 otáčkách a 4°C.
5. Do 2. sady zkumavek přepipetujeme 400 ml supernatantu, pipetujeme velmi opatrně, abychom nenabrali ani malé množství sraženiny. Zkumavku s buněčným odpadem vyhodíme.

6. Do 2 sady zkumavek přidáme 222 ml 96% ethanolu. Množství přidávaného alkoholu je v poměru 5/9 a vypočte se podle přímé úměry, tedy $V = (200\text{ml}/9) * 5$.
7. Po smíchání supernatantu a čistého alkoholu jemně promícháme dvojitým otočením zkumavky.
8. Přelijeme do sterilních zkumavek s filtrem – sada 3 (quiqgen-mini spin column).
9. Centrifugujeme 15 sekund při 20 000 otáčkách, při pokojové teplotě.
10. Vylijeme zkumavku s filtrátem, nadále budeme používat pouze horní frakci. V následujících krocích budeme promývat. Tyto kroky slouží k zvýšení výtěžku mRNA.
11. Do zkumavky napipetujeme 700 ml 1. promývacího roztoku RW1 a budeme centrifugovat 15 sekund při 20 000 otáčkách, při pokojové teplotě.
12. Vylijeme zkumavku s filtrátem a napipetujeme do ní 500 ml 2. promývacího roztoku RPE s ethanolem. Tento krok pro výslednou větší čistotu mRNA zopakujeme 2x.
13. Zkumavku s filtrátem vyhodíme a minikolonku přesadíme na čistou zkumavku. Budeme centrifugovat 1-2 minuty při 20 000 otáčkách, při pokojové teplotě. Tento krok se provádí kvůli důkladnému vysušení produktu.
14. Zkumavky s filtrem přesadíme na 4. sadu a přidáme 30 ul vody RNA-free water. Při pipetování je důležité u každé kolonky vyměnit špičku, protože se dotýkáme horní vrstvy silikagelu!
15. Centrifugujeme 1 minutu při 20 000 otáčkách, při pokojové teplotě. Při vkládání zkumavek do centrifugy dbáme na to, aby byly víčka otevřených zkumavek umístěna po směru otáčení centrifugy.
16. Izolovanou mRNA skladujeme v mrazáku při -70°C , dokud ji nepoužijeme pro reverzní transkripci do cDNA.

Měření koncentrace a čistoty RNA

Koncentrace RNA je stanovována spektrofotometricky v UV světle, měřením absorbance při 260 nm a 280 nm. Měření se provádí proti vodě (RNase-free). Odečítané hodnoty by neměly být menší než 0,15 a větší než 0,99. I ředění RNA je třeba provádět ve vodě RNA free.

Příklad nejčastějšího ředění RNA:

Orgán	přídavek RNA	přídavek vody RNA free	výsledné ředění
srdce	2 μ l	78 μ l	40x
játra	1 μ l	199 μ l	200x
ledviny	2 μ l	178 μ l	90x
nadledviny	6 μ l	54 μ l	10x
tuk	2 μ l	58 μ l	30x
sval	4 μ l	54 μ l	15x

Tabulka č.3 – nejčastější ředění RNA

Čistota RNA se určuje poměrem mezi hodnotami absorbance při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) s ohledem na kontaminanty absorbující v UV záření, např. proteiny a fenoly. Poměr A_{260}/A_{280} může být také výrazně ovlivněn hodnotou pH. Nižší pH dává nižší poměr A_{260}/A_{280} , a také menší senzitivitu k případné kontaminaci proteiny.

Při hodnocení čistoty vzorku jsou očekávané hodnoty u RNA v poměru A_{260}/A_{280} mezi 1,9 – 2,1. Poměr absorbancí 260/280 klesající pod 1,60 svědčí o kontaminaci bílkovinami.

Podle naměřené absorbance vzorků jsem stanovila optimální koncentraci jednotlivých orgánu, pro vstup do reakce – reverzní transkripce. Po-té jsem si vypočítala přídavek vody ke 20 μ l vzorku a naředila jsem všechny vzorky jednoho orgánu na stejnou koncentraci. Výsledné ředění, koncentrace a čistota RNA je znázorněna v následujících tabulkách.

Reverzní transkripce

Detekce a analýza molekul RNA patří k důležitým molekulárně biologickým postupům. Molekuly mRNA se podílejí pouze z 1 - 2% na celkovém množství izolované RNA (převážnou část tvoří rRNA). Adaptace amplifikačních technik umožňuje relativně snadnou analýzu mRNA tím, že po reverzní transkripci následuje amplifikace cDNA pomocí RT-PCR.

Materiál a reagenty:

- mRNA skladovaná v -70°C
- PCR zkumavky (0,2 ml)
- Oligo dT
- dNTP
- Voda RNase-free
- 5x First Standart Buffer
- DTT (dithiothreitol) = 0,1 M DTT (20 μM) – aktivace enzymů
- RNase OUTTM (40 U / μl), (Invitrogen)
- Superscrip III

Samotná reakce sestává ze dvou kroků – respektive vytvoření 2 mixů, které se do reakce přidávají. Sestavení receptury 1. mixu je závislé na koncentraci RNA příslušného orgánu. Do každé reakce by mělo být přidáno 1000 ng RNA. Proto byla receptura mixu 1 pro každou koncentraci orgánu jiná. Mix 2, byl již pro všechny proběhlé reakce stejný. Konkrétní ředění jednotlivých orgánů je znázorněno v tabulce č 5.

MIX 1	
oligo dT	1 μl
dNTP(c=10mM)	1 μl
voda free RNA	X μl
přídavek RNA	Y μl
velikost mixu	13 μl

Tabulka č.4 – Mix 1 pro reverzní transkripci pro orgány o různé koncentraci. X znázorňuje přídavek vody free RNA, Y je přídavek RNA příslušného orgánu.

Koncentrace orgánu	X (přídavek vody)	Y (přídavek RNA)
500 ng/l	9 μ l	2 μ l
390 ng/l	8,4 μ l	2,6 μ l
350 ng/l	8,1 μ l	2,9 μ l
150 ng/l	4,3 μ l	6,7 μ l
120 ng/l	2,7 μ l	8,3 μ l
100 ng/l	1 μ l	10 μ l
53 ng/l	0 μ l	11 μ l
54 ng/l	0 μ l	11 μ l

Tabulka č. 5 znázorňuje přídavky vody free RNA a RNA do reakce, podle koncentrace jednotlivých vzorků

Nejvíce koncentrované byly játra a ledviny u potkanů obojího stáří a srdce u potkanů starých 4 dny. U těchto orgánů jsem sjednotila koncentraci jednotlivých vzorků na 500 ng/l. Výsledná koncentrace vzorků u hnědého tuku u potkana starého 1 den, je 390 ng/l. Vzorky srdce potkana starého jeden jsem sjednotila na koncentraci 350 ng/l. U potkana starého 4 dny, byla koncentrace hnědého tuku nižší, vzorky jsem naředila na koncentraci 150 ng/l. Koncentrace svalu odebíraného ze zadní končetiny byla u potkanů obojího stáří podobná. U potkana starého jeden den to byla 120 ng/l, u potkana starého 4 dny koncentrace vzorků činí 100 ng/l.

Nadledviny u potkanů obojího stáří jsou velmi málo koncentrované, u potkana starého 1 den je to 53 ng/l, u potkana starého 4 dny 54 ng/l. S touto koncentrací bohužel nelze docílit přídavku 1000ng RNA do reakce. Abych se tomu co nejvíce přiblížila, zcela jsem vypustila přídavek vody.

Mix1 jsem rozpipetovala do zkumavek velkých 0,2 ml a okamžitě dala denaturovat do cykleru na 5 minut, při 65°C. Mezi vzorky jsem přidala jednu zkumavku, do které jsem místo RNA napipetovala vodu RNA free. Tato zkumavka bude sloužit jako negativní kontrola, která nám bude podávat informaci, zda nedošlo během transkripce ke kontaminaci RNA. V průběhu inkubace vzorků v cykleru, jsem si připravila Mix2, který byl již pro všechny vzorky stejný. (Viz tab.č.6)

MIX 2	
5x First Standart Buffer	4 μ l
DTT	1 μ l
Rase OUT™	1 μ l
SS III	1 μ l
velikost mixu	7 μ l

Tabulka č.6 - Mix 2 pro reverzní pro všechny orgány

Po inkubaci jsem vzorky vyndala na chladicí stojánek a nechala minutu odstát. Pak jsem připipetovala mix 2 a okamžitě znovu vložila do cyklu. Zkumavky jsem nechala inkubovat jednu hodinu při 50°C a pak 15 minut při 70°C. Po inkubaci jsem vzorky opět vyndala na chladicí stojánek a s výjimkou nadledvin je zředila do 100 μ l vodou RNA free. Nadledviny byly málo koncentrované, nebylo tedy možné do reakce přidat požadovaných 1000ng RNA. Zředila jsem je tedy RNA free vodou pouze do 50 μ l. Takto připravené vzorky cDNA jsem vložila do mrazáku při -70°C, kde jsem je ponechala do dalšího zpracování.

Real-time PCR

Izolovaná RNA je nejprve reverzní transkripcí přepsána do komplementární DNA (cDNA) a ta se pak použije jako templát pro amplifikaci. Real-time PCR je metoda umožňující přesnou kvantifikaci hledané cDNA sekvence ve vzorku. Využívá se zde několika možností detekce narůstajícího množství ampliconů. Všechny jsou založeny na nárůstu fluorescence

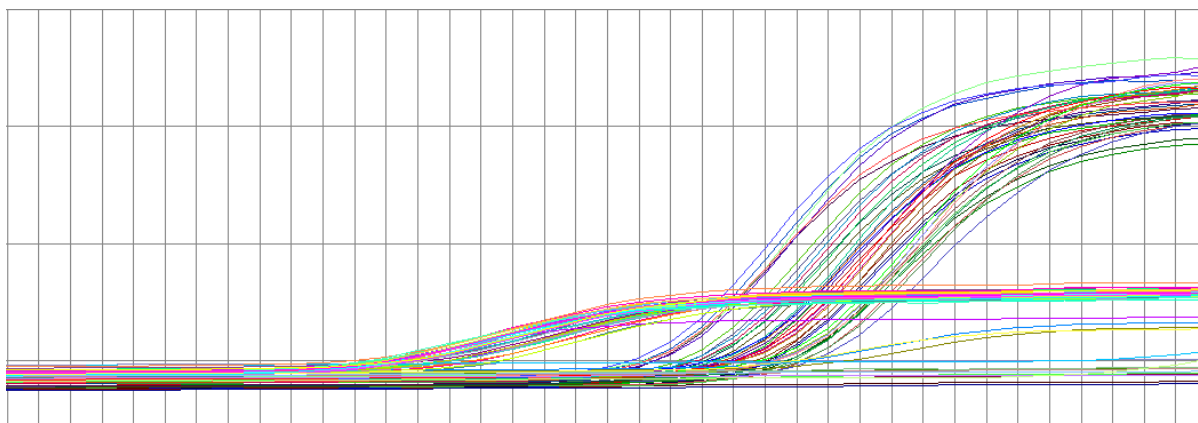
Real-time PCR je metoda založená na klasické polymerázové řetězové reakci (PCR) s tím rozdílem, že je možné její průběh sledovat přímo během reakce, tzv. v „reálném čase“. Umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu n rozdíl od PCR, kde se detekuje až finální produkt. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčních sond či barviv, které se váží na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace.

Real-time PCR se provádí v termocyklerech s optikou, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak excitaci substrátů s následnou detekcí fluorescence v každé jamce. Standardně se používají 96 jamkové cyklery, je možné však použít i cyklery s 384 jamkami.

Hlavní výhodou oproti klasické PCR je tedy možnost kvantifikace syntetizovaného produktu. Ta může být buď relativní, kdy vzorky porovnávám s jinou – kontrolní skupinou vzorků, a nebo absolutní, kdy pro reakci použijeme rekombinantní DNA o známé koncentraci. V tomto případě pak získáme kalibrační křivku, ze které odečítáme fluorescenci. Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a při hodnocení platí skutečnost, že čím vyšší je obsah nukleové kyseliny v testovaném vzorku (např. mRNA jako výraz úrovně exprese daného genu), tím rychlejší je přírůstek fluorescence.

Typická amplifikační křivka má esovitě zakřivený tvar (viz obr.č.6) a lze ji rozdělit na 3 části:

1. „background“ fázi kdy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot
2. exponenciální fázi, kdy množství produktu exponenciálně roste. Tato fáze trvá asi 4 až 8 cyklů.
3. fáze plató, kdy dochází k saturaci systému. Množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní. Čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popřípadě překročí určitý fluorescenční práh, tím více startovních templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce.



Obr.č.6 - Amplifikační křivka *Plzf* - 4.den, játra+srdce. Horní křivky - exprese *Plzf*, dolní křivky – exprese *GAPDH*.

Real-time PCR - kvantifikace

Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vnesením naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu. Používané matematické modely pracují s hodnotou zvanou C_T (threshold cycle), která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí zmíněný fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce.

Ke stanovení exprese u vzorků jsem použila relativní kvantifikaci. Je možné využít i absolutní kvantifikaci, ta se používá např. při detekci specifických mikroorganismů a přímo determinuje výchozí počet kopií cílových molekul.

Relativní kvantifikace, která se používá ke stanovení míry genové exprese, zpravidla nevyžaduje sestavení kalibrační přímky. Porovnává se relativní změna genové exprese (relativní expresní poměr) v testovaném vzorku oproti kontrolnímu vzorku. C_T amplifikační křivky daného genu se vždy normalizuje oproti C_T housekeeping genu.

Detekční systémy

Prvními látkami používanými pro detekci akumulace produktu během real-time PCR byla interkalační barviva (ethidium bromid, SYBR Green I), jejichž fluorescenční aktivita vzrůstá po vazbě na dvouřetězcovou DNA. Vzhledem k tomu, že během PCR vzniká dvouřetězcový produkt, jehož množství zpravidla výrazně převyšuje počáteční množství DNA, lze pomocí interkalačních barviv sledovat průběh amplifikace.

Velkou nevýhodou interkalačních barviv je skutečnost, že detekují veškerou DNA přítomnou v reakční směsi včetně nespecifických produktů amplifikace (jako jsou např. tzv. primer - dimer artefakty), které i při velmi pečlivé optimalizaci metody velmi často vznikají. Specifita detekce je navíc dána pouze sekvencemi primerů.

Elegantní řešení co se týče detekce nespecifických produktů nabízejí často využívané oligonukleotidové sondy. Jedná se o fluorescenčně značené oligonukleotidy, které hybridizují s určitou cílovou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu a výrazně přitom zvyšují svou fluorescenční aktivitu. Jejich výhodou je vysoká specifita, jelikož detekce cílové sekvence probíhá ve 2 stupních - na úrovni vazby primerů a rovněž na úrovni vazby sondy.

V současnosti je asi nejvíce rozšířená metoda využívající 5' - exonukleázové aktivity DNA polymerázy. Klíčovým je zde použití oligonukleotidu – próby (nejčastěji TaqMan sonda), která se specificky váže na sekvenci mezi oběma primery. Sonda je na jednom svém konci označena fluorescenční látkou a na druhém konci zhasičem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje DNA polymeráza sondu, dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase. Na základě standardizačních křivek lze přesně kvantifikovat množství hledané cDNA sekvence ve vzorku.

Real-time PCR amplifikace

Použili jsme metodu detekce založenou na odbourávání fluorescence značené sondy (technologie TaqMan).

V této fázi dochází k cílené amplifikaci vzorku cDNA, vytvořeného dřívějším prepisem z RNA, za použití sekvenčně specifického *Plzf* primeru a TaqMan próby (označené fluorescenčním barvivem) obsažených v TaqMan Gene expression.

Zásobní TaqMan Gene Expression kity jsou uchovávány v mrazničce a chráněné před světlem až do doby bezprostředního použití. Osvětlení chemikálií by mohlo mít vliv na fluorescenční próby obsažené v kitu. Chemikálie se po rozmrazení uchovávají v chladicím stojánku, po použití jsou opět uloženy do mrazničky.

Materiál a reagenty:

- cDNA uchovávaná při -70°C
- Voda RNase free
- Master Mix
- *Plzf* primer
- GAPDH ředěná 1:1:1 (forward, reverse, probe)

Příprava reakčního mixu pro kvantifikaci stanovovaného (target) genu *Plzf*

Target gen	Přídavek do 1 reakce
Master Mix	12,5 μl
<i>Plzf</i> primer	1,5 μl
voda RNase free	6 μl

Tabulka č.7 – receptura pro přípravu reakčního mixu stanovovaného genu

Příprava reakčního mixu pro kvantifikaci housekeeping genu GAPDH

GAPDH	Přídavek do 1 reakce
Master mix	12,5 μl
GAPDH(1:1:1)	0,75 μl
voda RNase free	6,75 μl

Tabulka č.8 – receptura pro přípravu reakčního mixu housekeeping genu

Před započítím práce, jsem nejprve otřela stoly 96% ethanolem, abych zabránila případné kontaminaci vzorků. Rozmrazila jsem si vzorky cDNA a potřebné chemikálie. Na chladícím stojánku jsem si připravila dva reakční mixy, podle výše uvedeného návodu. Kvůli zpřesnění výsledků a minimalizaci chyby, jsem při práci používala automatickou dvanácti-kanálovou pipetu. Reakci jsem prováděla na mikrotitrační 96 jamkové destičce. Nanášela jsem 21 vzorků (od každého kmene potkanů 7) dva orgány na destičku a tři kontroly. Jednu negativní z reverzní transkripce, pozitivní genomickou kontrolu (PD5 nebo SHR) a negativní Lx ocas. Na následujícím obrázku je znázorněn rozpis stripů pro rozpipetování mixu a příslušného vzorku cDNA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P2	P3	P4	P5	P61	P62	S7	S8	S9	S50	S53
	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra
B	S55	S63	S30	SP48	SP49	SP51	SP54	SP56	SP66	NEG	genom	
	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	SHR	Lx ocas
C	P1	P2	P3	P4	P5	P61	P62	S7	S8	S9	S50	S53
	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce
D	S55	S63	S30	SP8	SP49	P51	54	SP56	SP66	NEG	Genom.	
	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	SHR	Lx ocas
E	P1	P2	P3	P4	P5	P61	P62	S7	S8	S9	S50	S53
	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra
F	55	S63	S30	SP48	SP49	SP51	SP54	SP56	SP66	NEG	Genom.	
	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	játra	SHR	Lx ocas
G	P1	P2	P3	P4	P5	P61	P62	S7	S8	S9	S50	S53
	srdce	srdce	srdce	srdce	sdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce
H	S55	S63	S30	SP8	SP49	P51	54	SP56	SP66	NEG	Genom.	
	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	srdce	SHR	Lx ocas

Tabulka č.9 - mikrotitrační destička játra a srdce 1.den

Nanesení reakčních mixů na destičku

Ze zásobního reakčního mixu pro stanovovaný gen jsem napipetovala do každé jamky na destičce 20 μ l reakčního mixu. Do jamek A až D přijde reakční mix pro kvantifikaci stanovovaného (target) genu Plzf, do jamek E až H jsem napipetovala reakční mix pro kvantifikaci housekeeping genu GAPDH. K tomu jsem podle výše znázorněné tabulky přidala od každého vzorku 5 μ l cDNA.

Do třech jamek ke každému mixu jsem přidala místo cDNA pouze vodu (slepý vzorek = negativní kontrola) nebo genomickou DNA, která slouží jako kontrola pozitivní.

Destičku jsem překryla adhesivním průhledným krytem, který zabraňuje kontaminaci nečistotami.

Destičku je vhodné mírně protřepat a následně stočit na centrifuze při maximálních otáčkách (2 500 otáček za minutu) 1 minutu. Hlavním důvodem je aby reakční mix stekl ze stěn a odstranily se případné vzduchové bublinky, které by bránily v detekci.

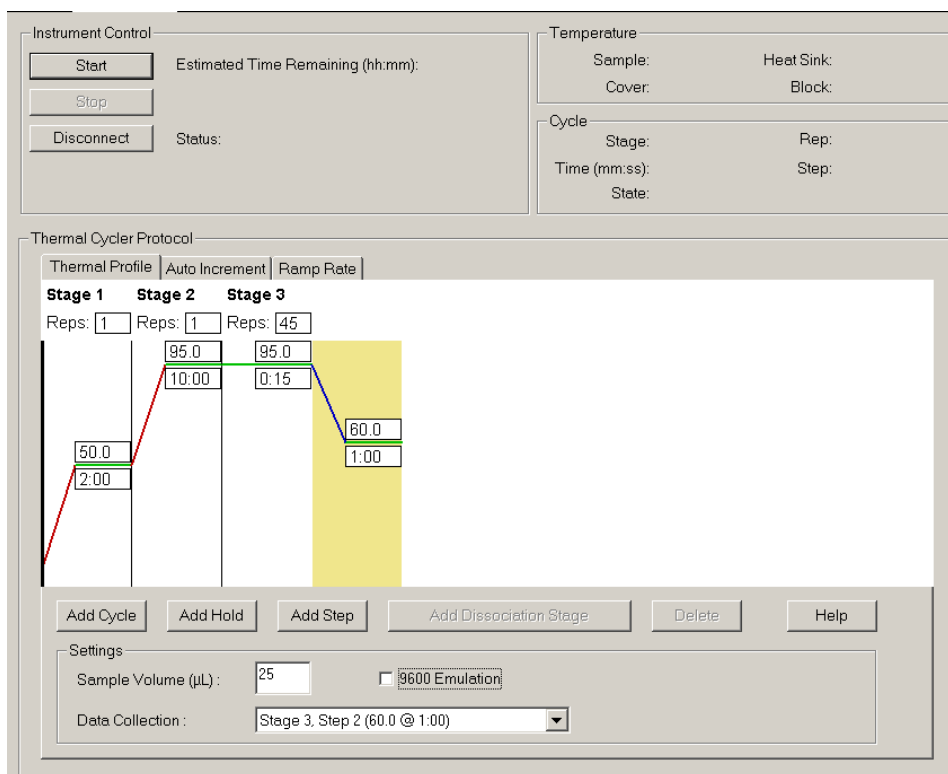
Pokud není možné provést Real-time PCR amplifikaci okamžitě, je nutné napipetovanou destičku uložit krátkodobě v chladničce.

Amplifikační procedura

	počáteční aktivace	denaturace	denaturace	anealing/elongace
cykly	1	1	45	45
čas	2 min	10 min	15 s	1 min
teplota	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C

Tabulka č.10 - amplifikace

Přípravenou mikrotitrační destičku jsem vložila do termocykleru. Po zapnutí, si přístroj ověřil přítomnost vzorků a mohla jsem nastavit protokol amplifikačního procesu. Zvolila jsem relativní kvantifikaci a do připravené tabulky vložila názvy vzorků tak, jak jsem je nanášela na destičku. V protokolu je nutné nastavit správný počet cyklů a také se nesmí opomenout nastavit správný objem stanovovaného vzorku, což v mém případě bylo 25 μ l. (Viz obr.č.7).



Obr. č.7 - amplifikace

Real-time PCR při tomto nastavení probíhala 1 hodinu a 45 minut. Po skončení amplifikačního protokolu jsem destičku vyndala z cykleru, a jelikož jsem jí nepotřebovala pro další zpracování, nebylo nutné ji nadále uchovávat.

Statistické zpracování

Výsledky jsem hodnotila v programu Statistica verze 8. Použila jsem metodu analýzy rozptylu vícenásobného třídění (two way ANOVA), s faktory genotyp a replikát. Za signifikantní výsledek je možné považovat takový, u kterého hodnota dosažené hladiny významnosti (p) nepřekročila hodnotu 0,01. Zvolila jsem hodnotu nižší než 0,05, abych se vyhnula sporným výsledkům. Ke statistickému zhodnocení jsem použila hodnoty dCt , které mají zhruba normální rozdělení. Hodnotu relativní exprese (RQ) jsem počítala podle těchto vzorců:

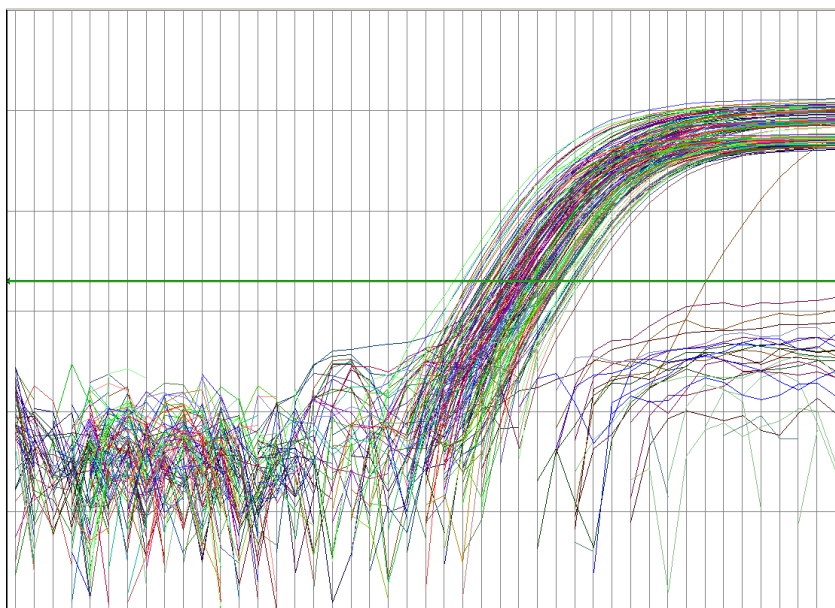
- 1) Normalizace na expresi u SHR = 100%

$$ddCt(i) = dCt(i) - dCt(SHR)$$

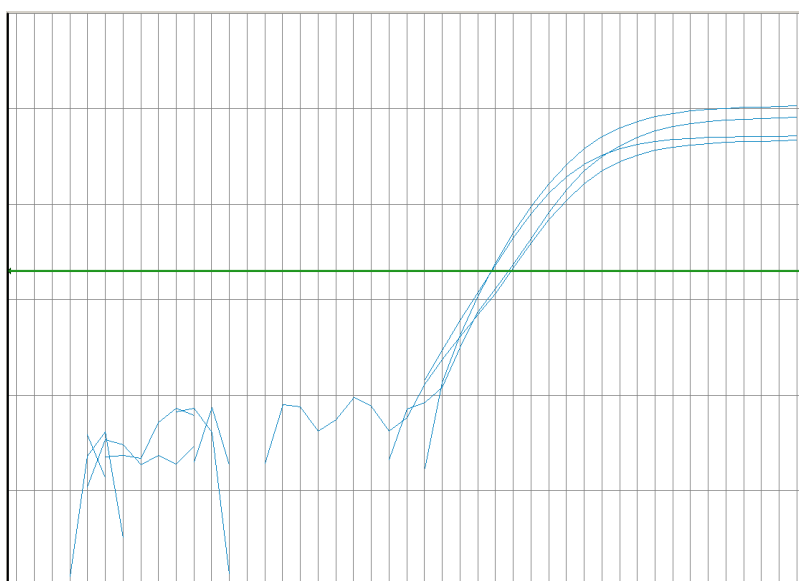
- 2) Relativní kvantifikace $RQ = 2^{-ddCt}$

Výsledky

Od potkanů starých 1 a 4 dny, jsem odebrala orgány a po zpracování u nich provedla RT – PCR. Pro zajištění dostatečné reprodukovatelnosti výsledků, jsem opakovala RT - polymerázovou řetězovou reakci u každého stanovovaného orgánu čtyřikrát.



Obr. č.8 - Játra 4.den 1-4 replikát

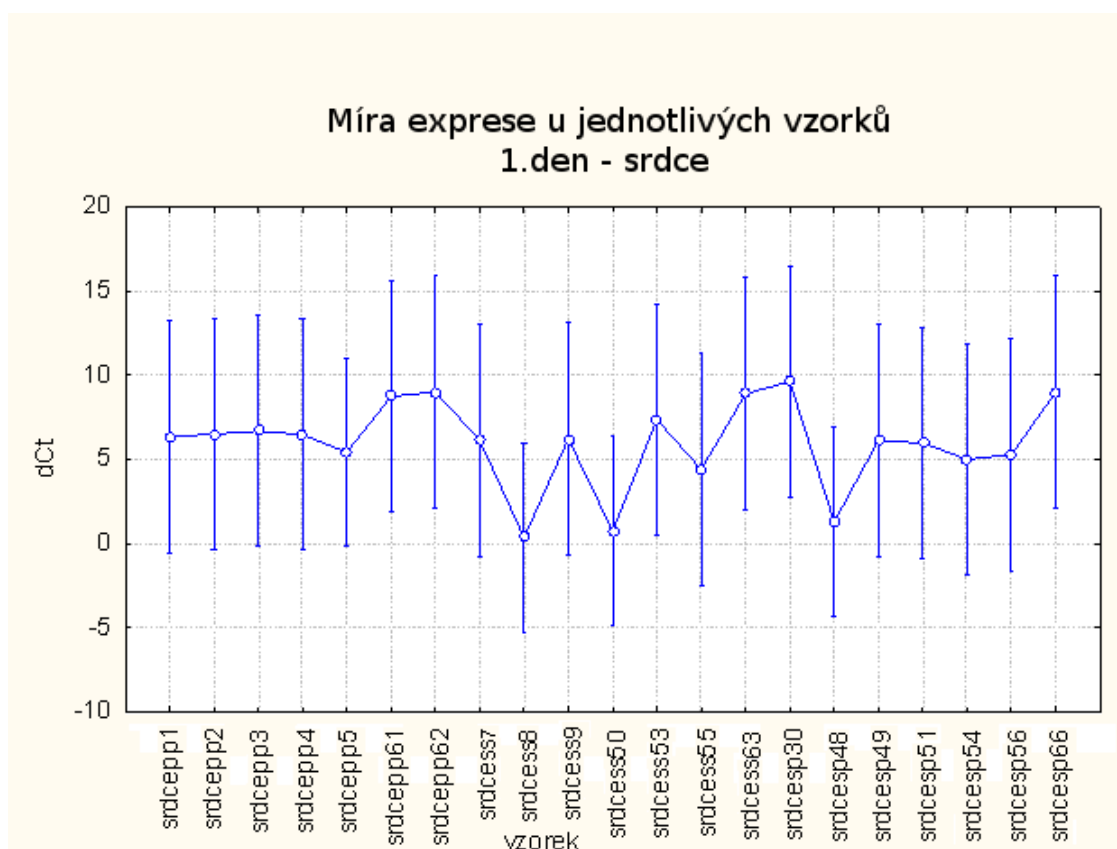


Obr.č.9 - Játra,vzorek p19, 1-4 replikát. Graf znázorňuje expresi Plzf u jednotlivých replikátů. Je patrné, že se neliší o více než jeden cyklus RT-PCR.

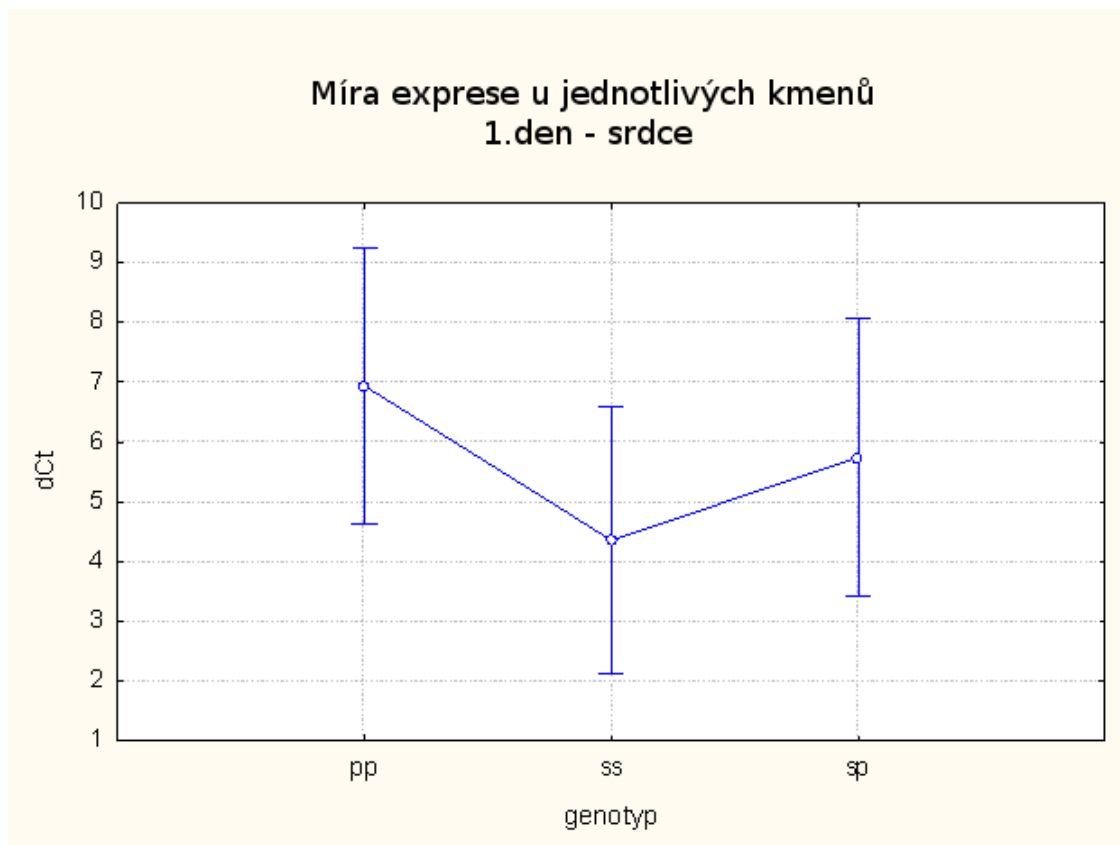
1.den

Nejprve jsem zpracovávala orgány potkanů starých jeden den. Jelikož byly orgány velmi malé, bylo důležité pracovat velmi obezřetně, aby bylo docíleno co největšího možného výtěžku. U každého orgánu jsem provedla reverzní transkripci s následnou Real-time PCR. Výsledky jsem hodnotila v programu Statistica verze 8 metodou analýzy rozptylu vícenásobného třídění (two way ANOVA), s faktory genotyp a replikát.

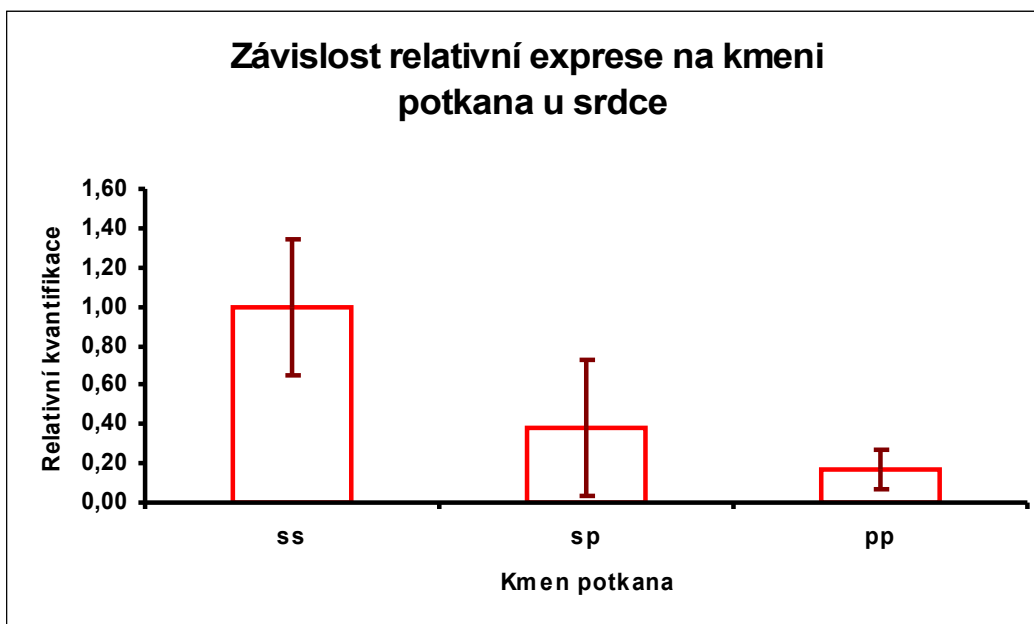
Srdce



Graf č.1- Míra exprese u srdce potkana starého jeden den u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plef} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,71154$.



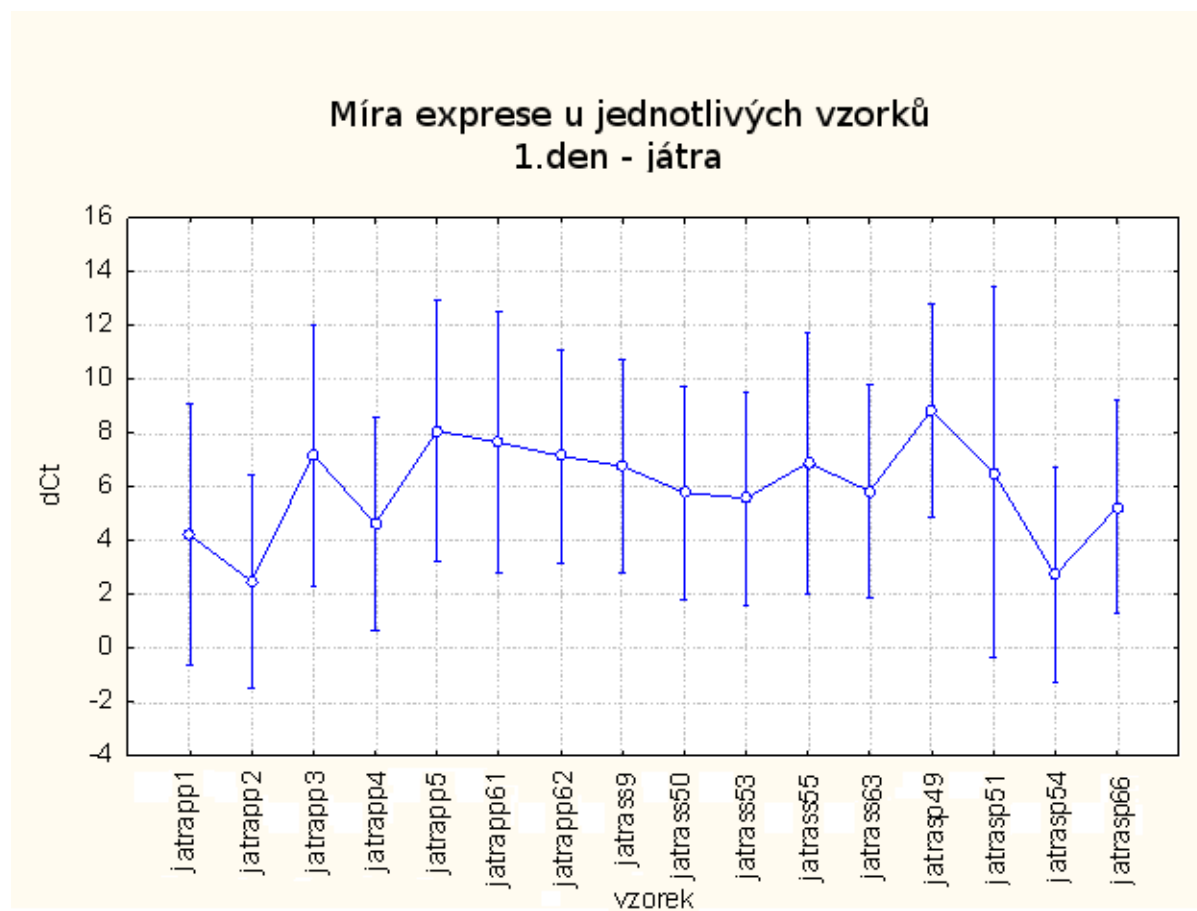
Graf č.2- Míra exprese u srdce u potkana starého jeden den u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,28074$.



Graf č.3 - Relativní exprese (RQ) u srdce u potkana starého jeden den. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

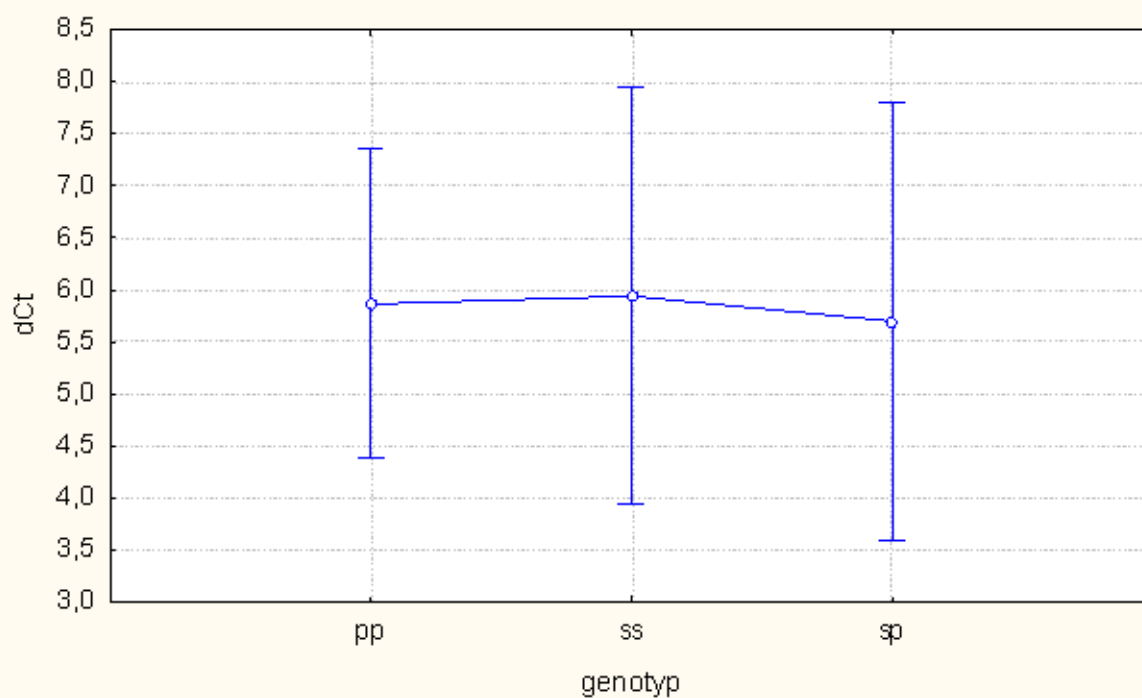
U srdce potkana starého jeden den, je patrná vyšší exprese u kmene SHR oproti kmeni SHR-Lx. Heterozygoti mají střední úroveň exprese, což ukazuje na aditivní účinek alely SHR. Hladina významnosti p je 0,28074. Vzhledem k vysoké hodnotě hladiny významnosti nelze výsledek označit za signifikantní.

Játra

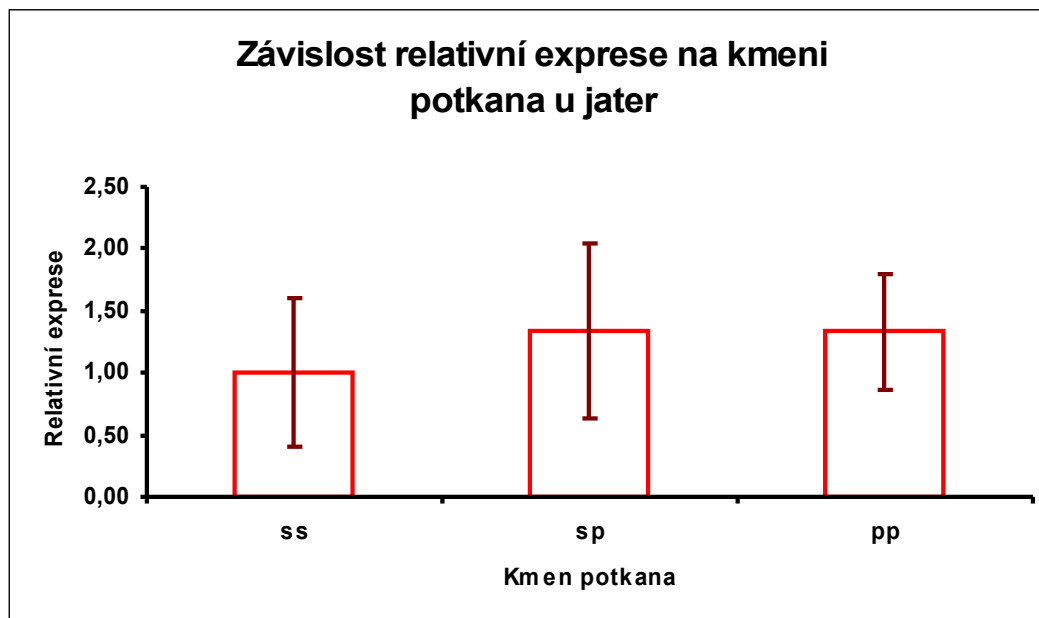


Graf č.4 - Míra exprese u jater potkana starého jeden den u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plcf} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,67764$.

Míra exprese u jednotlivých kmenů 1.den - játra



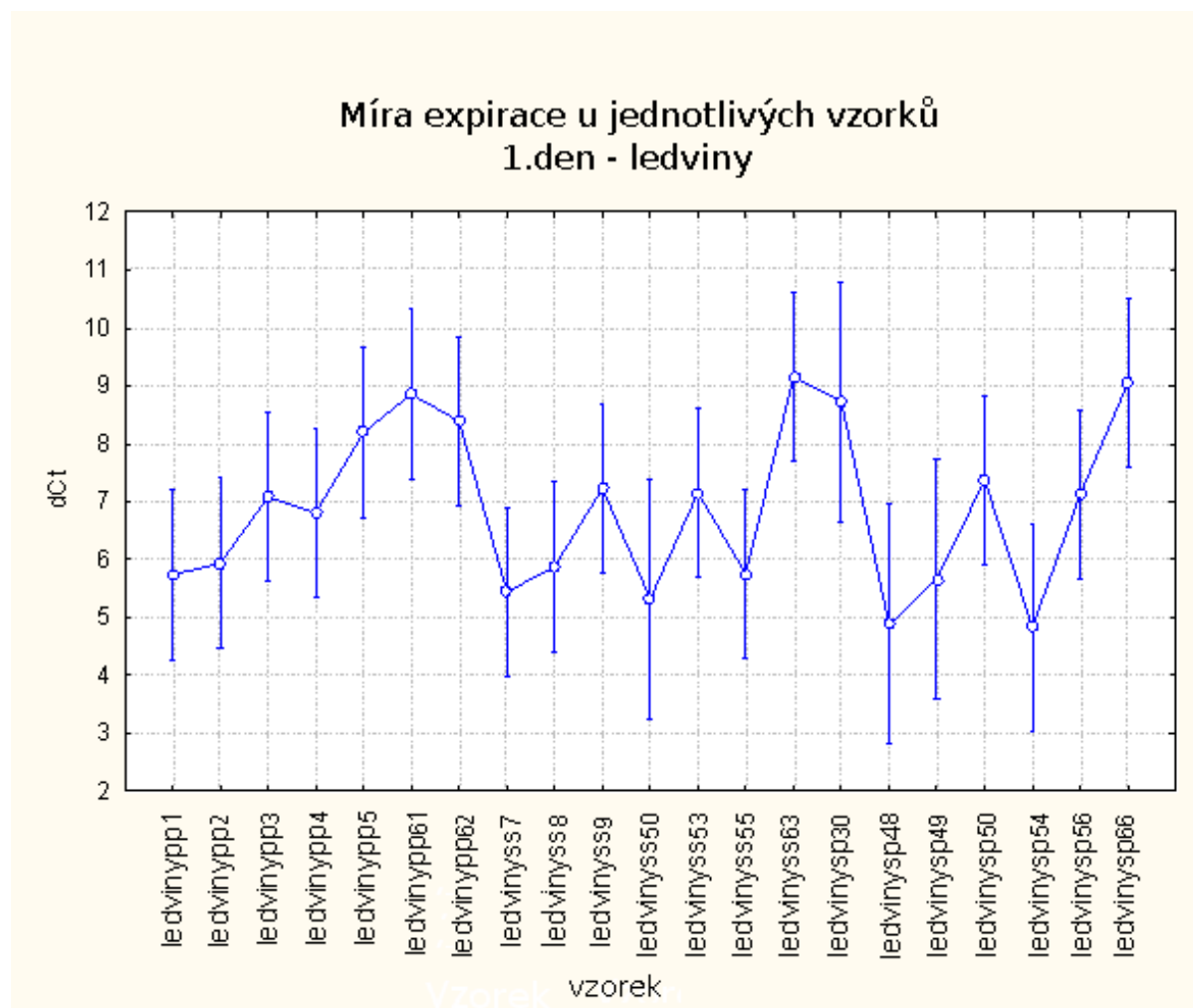
Graf č.5 - Míra exprese u jater potkana starého jeden den u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,9853$.



Graf č.6 - Relativní exprese u jater potkana starého jeden den. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

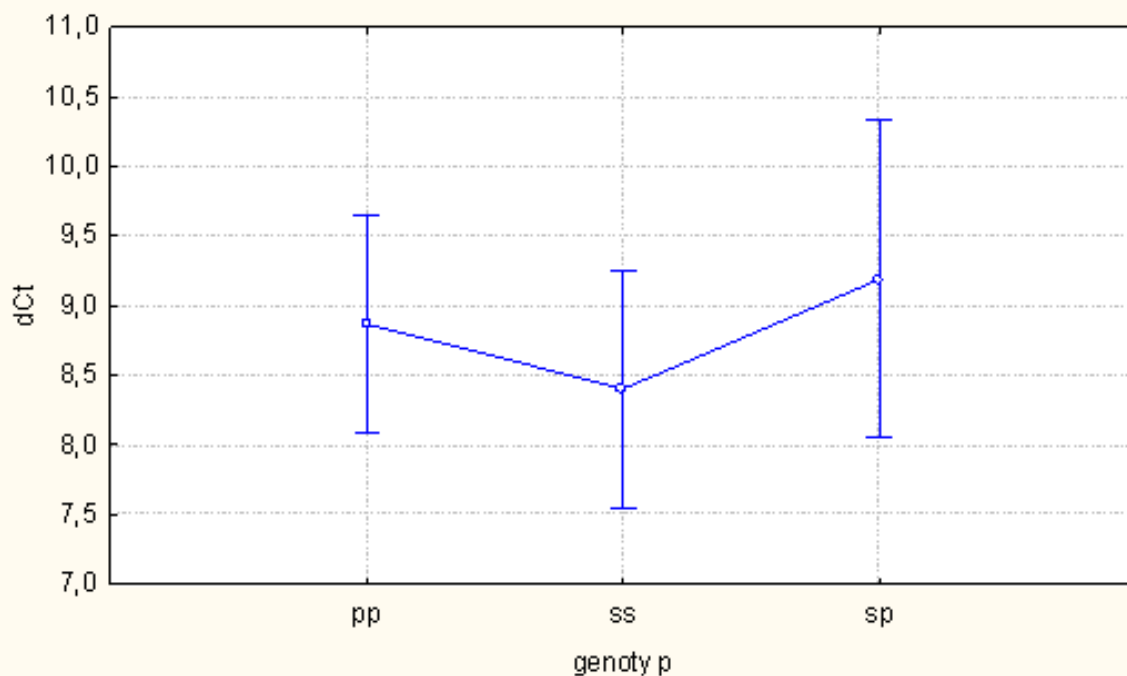
U jater potkana starého jeden den, nejsou patrné takřka žádné rozdíly v expresi mezi jednotlivými kmeny. Hladina významnosti testu je 0,9853.

Ledviny

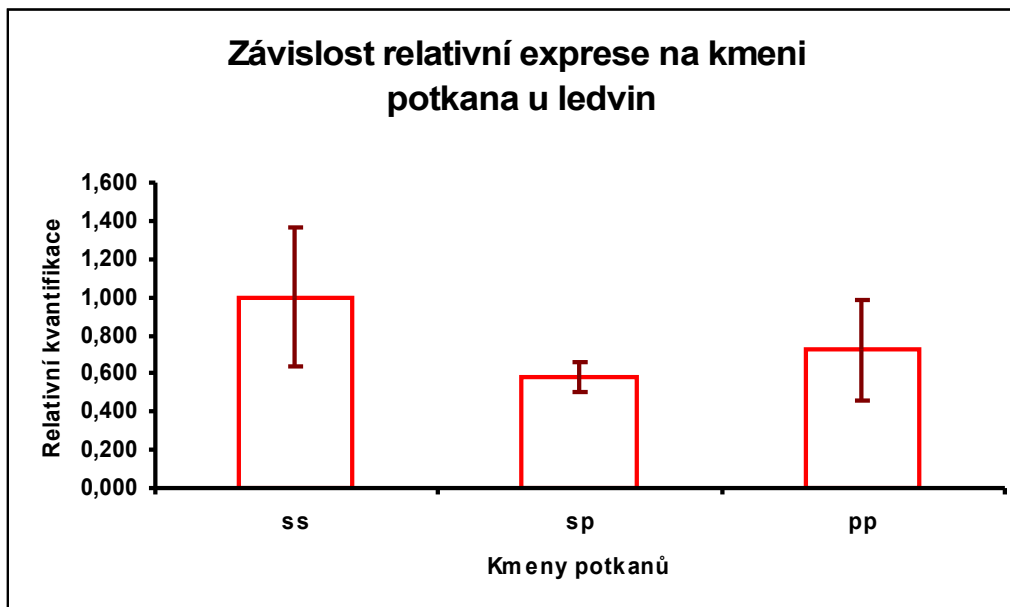


Graf č.7 - Míra exprese u ledvin potkana starého jeden den u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Ptef} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,00016$.

Míra exprese u jednotlivých kmenů 1.den - ledviny



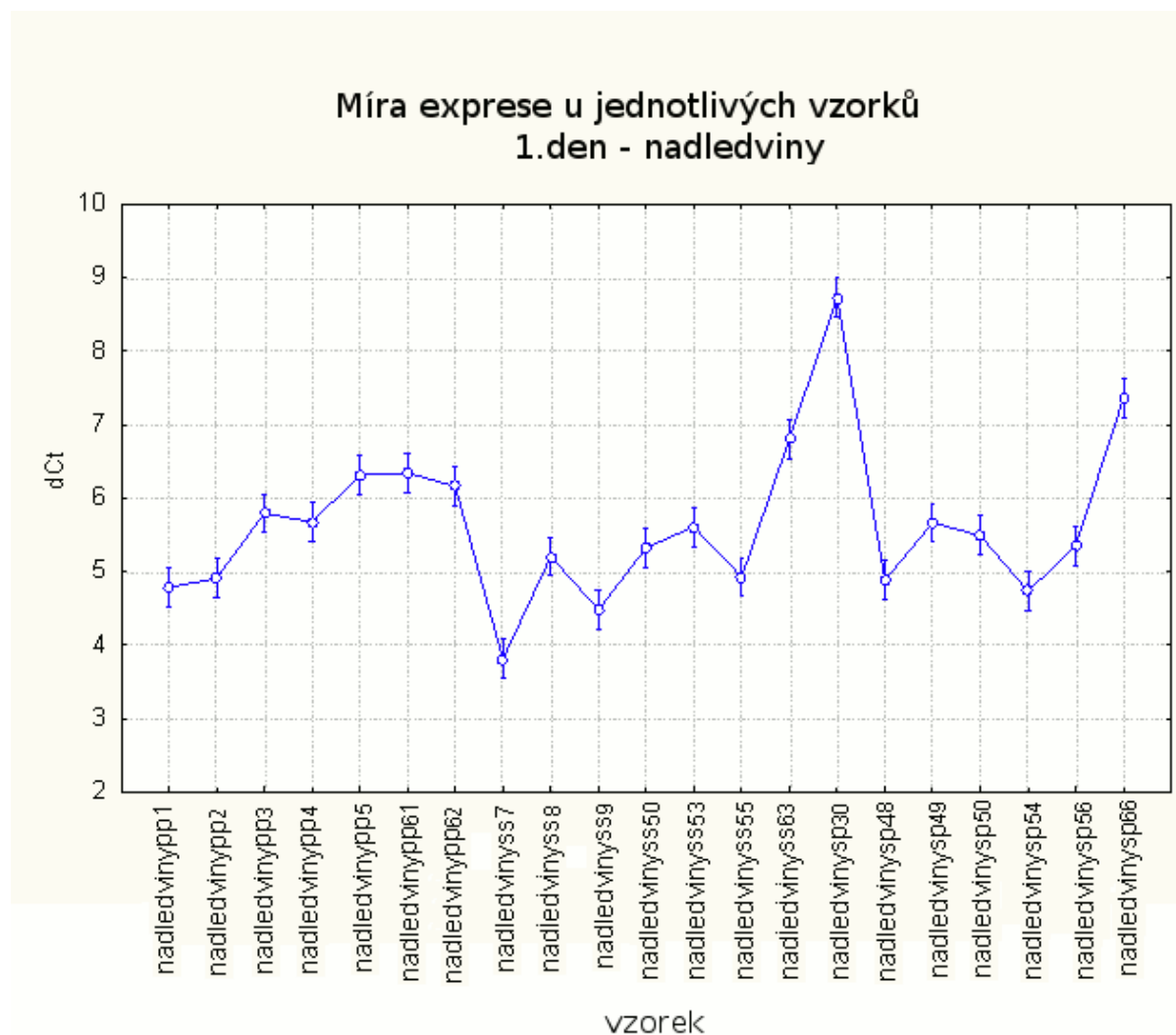
Graf č.8 - Míra exprese ledvin u potkana starého jeden den u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,5115$.



Graf č.9 - Relativní exprese ledvin u potkana starého jeden den. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

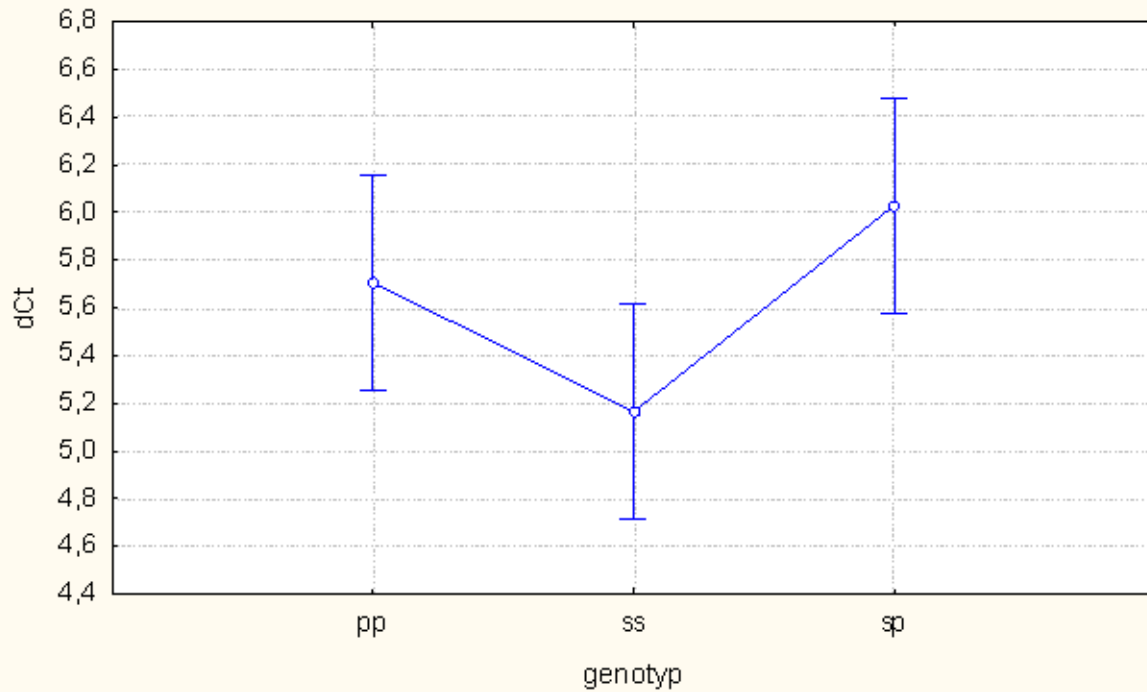
U ledvin potkana starého jeden den, je patrná vyšší exprese u kmene SHR. Hladina významnosti testu je 0,5115. Vzhledem k vysoké hodnotě hladiny významnosti nelze říci, že by byl výsledek signifikantní, ani s přihlédnutím na expresi u jednotlivých vzorků.

Nadledviny

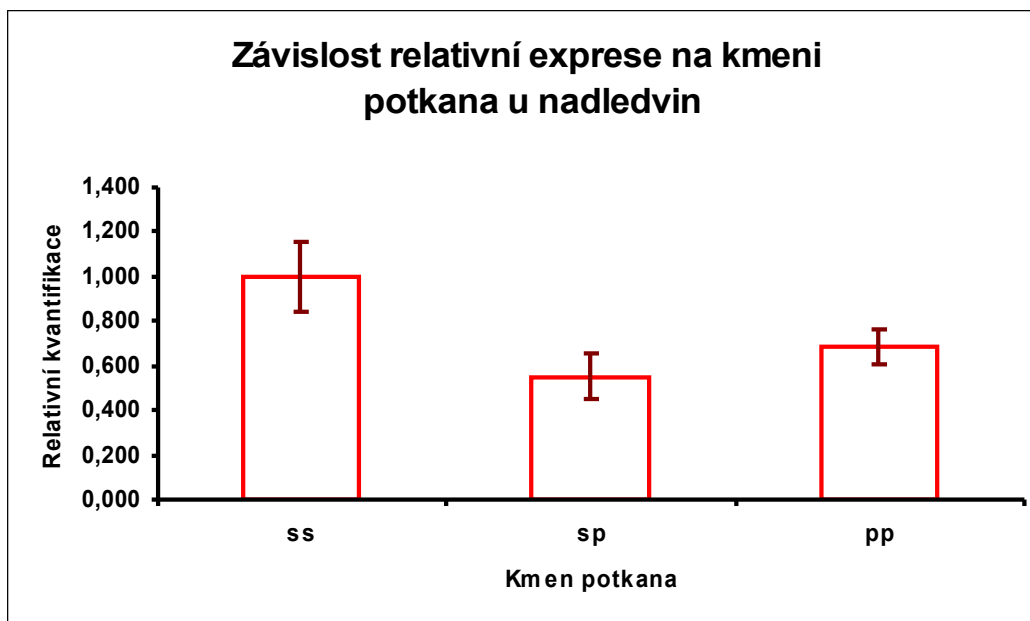


Graf č.10 - Míra exprese nadledvin u potkana starého jeden den u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,0001$.

Míra exprese u jednotlivých kmenů 1.den - nadledviny



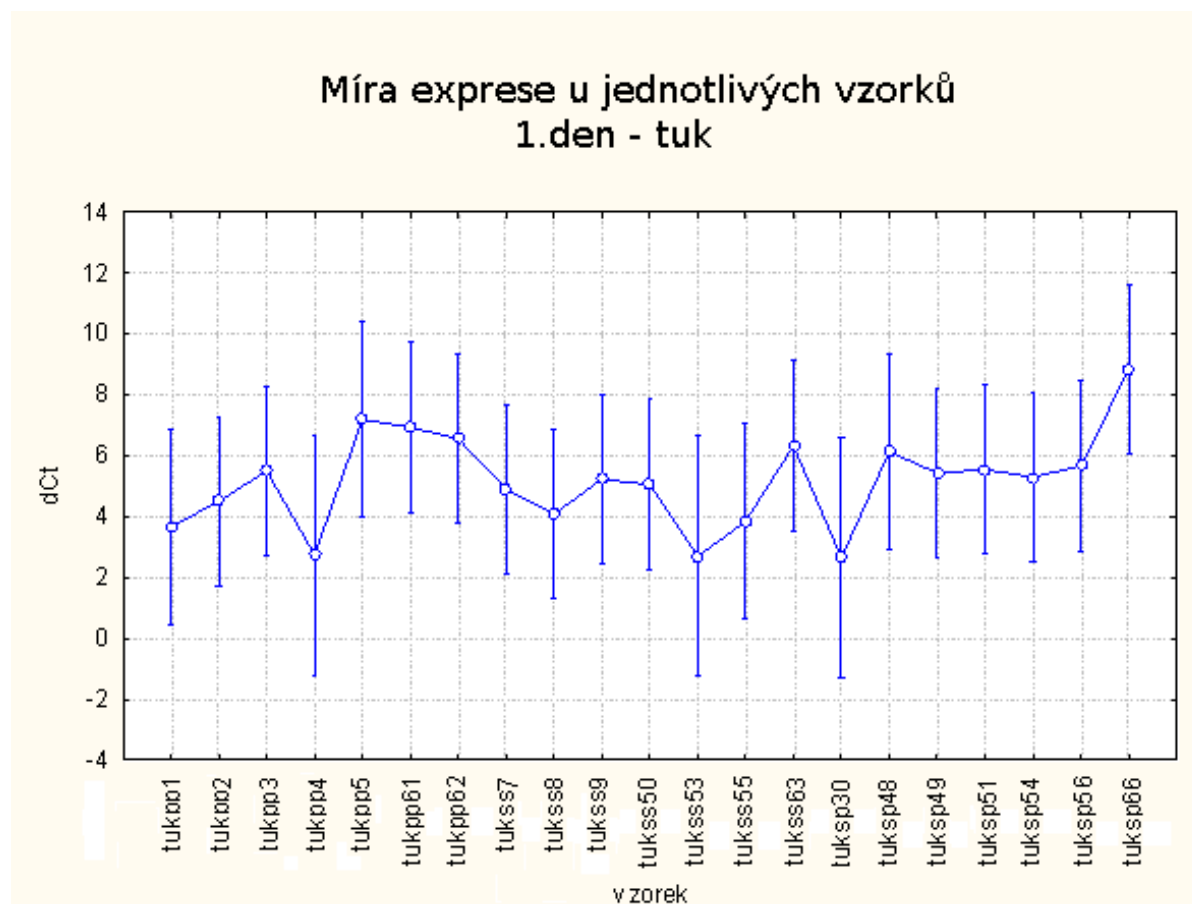
Graf č.11 - Míra exprese nadledvin u potkana starého jeden den u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti = 0,0298.



Graf č.12 - Relativní exprese nadledvin u potkana starého jeden den. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

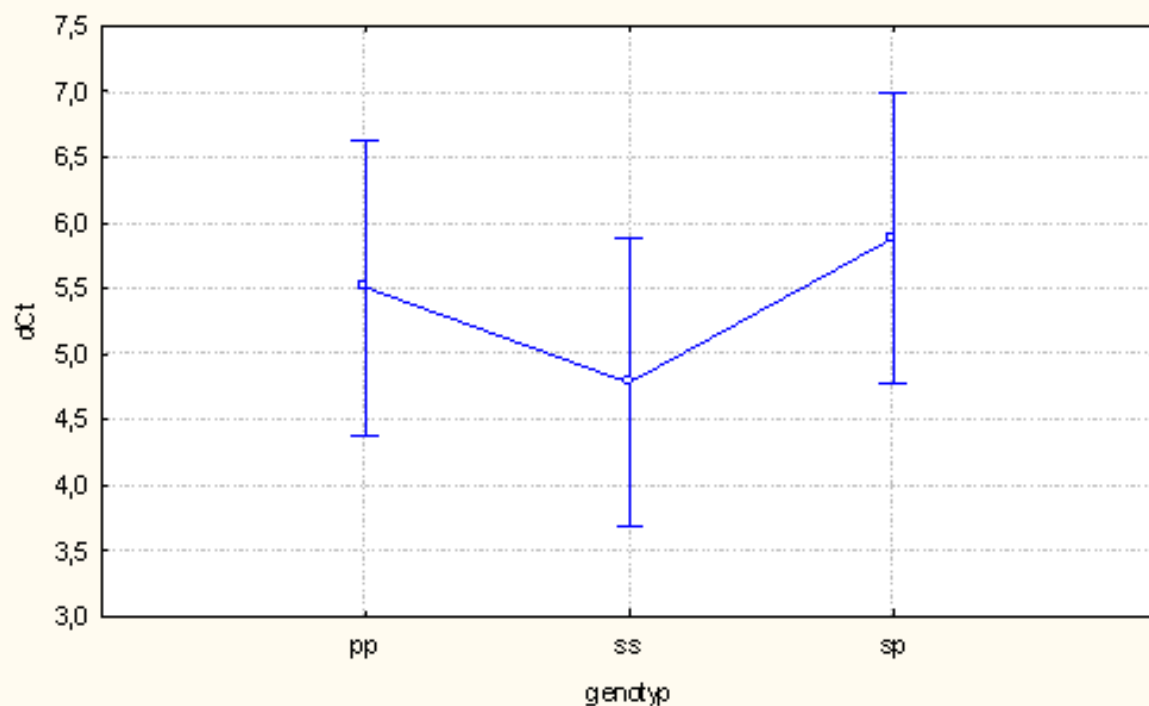
U nadledvin potkana starého jeden den, je patrná vyšší exprese u kmene SHR oproti kmeni SHR-Lx a heterozygotům. Nižší expresi lze pozorovat i mezi kmeny jednotlivých vzorku. Hladina významnosti testu je 0,02908, tato hodnota je však stále vysoká. Konfidenční intervaly jednotlivých kmenů se překrývají, nelze tedy s jistotou výsledek označit za signifikantní.

Tuk

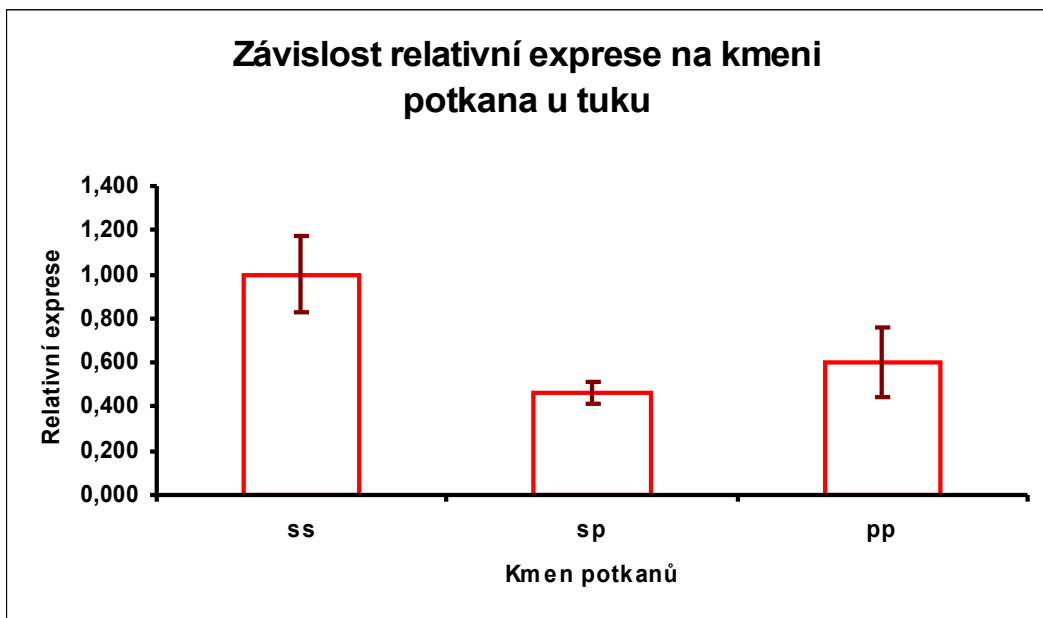


Graf č.13 - Míra exprese tuku u potkana starého jeden den u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,5183$.

Míra exprese u jednotlivých kmenů 1.den - tuk



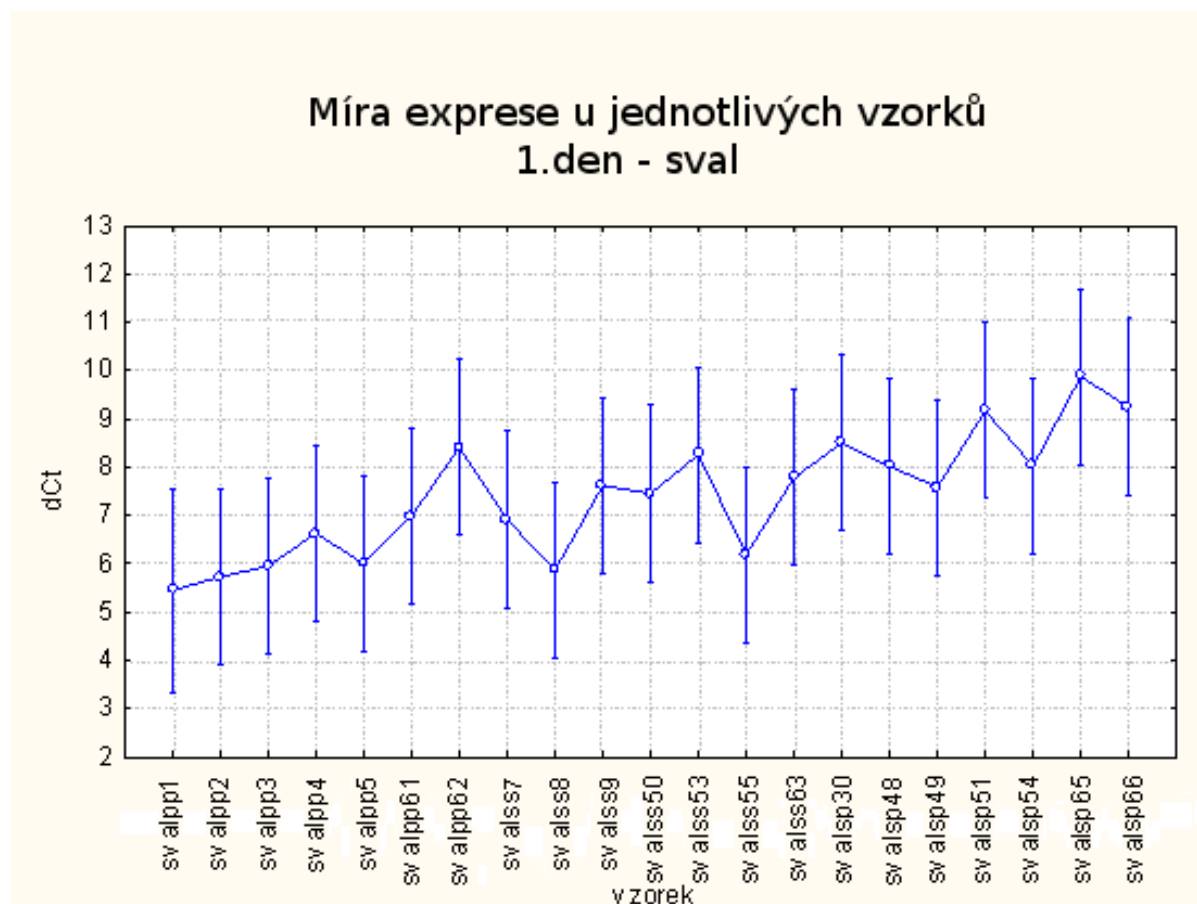
Graf č.14 - Míra exprese nadledvin u potkana starého jeden den u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,3634$.



Graf č.15 - Relativní exprese nadledvin u potkana starého jeden den. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

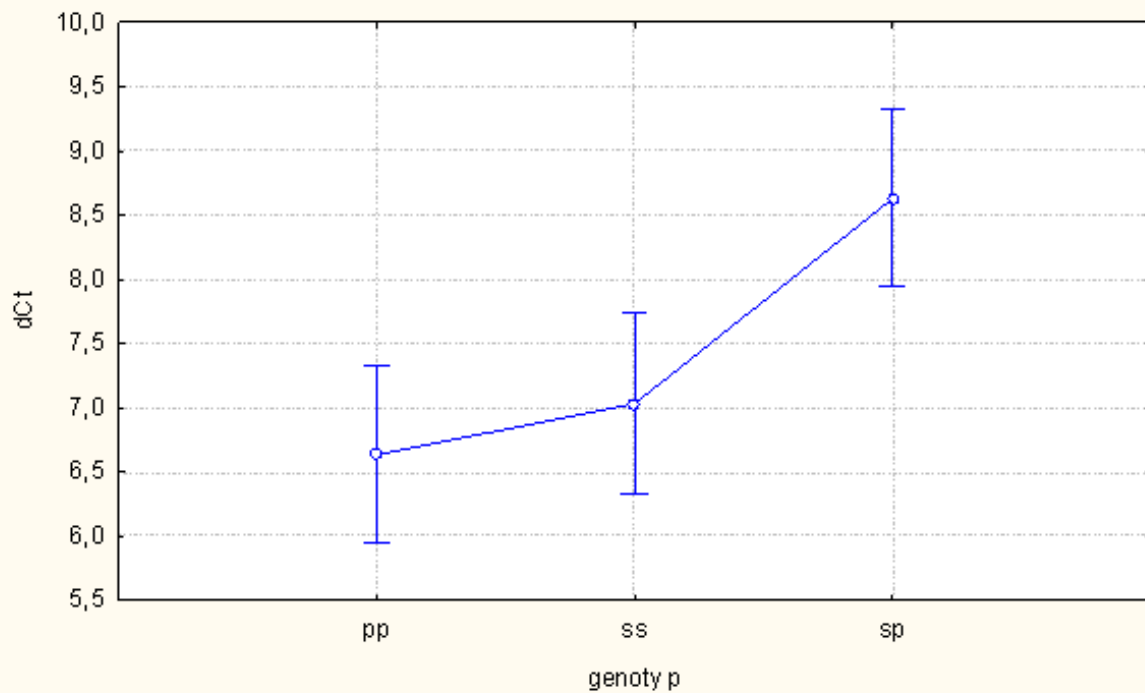
U hnědého tuku potkana starého jeden den, je patrná vyšší exprese u kmene SHR. Hladina významnosti testu je 0,3634. Vzhledem k vysoké hodnotě hladiny významnosti a expresi u jednotlivých vzorků nelze říci, že by byl výsledek signifikantní.

Sval

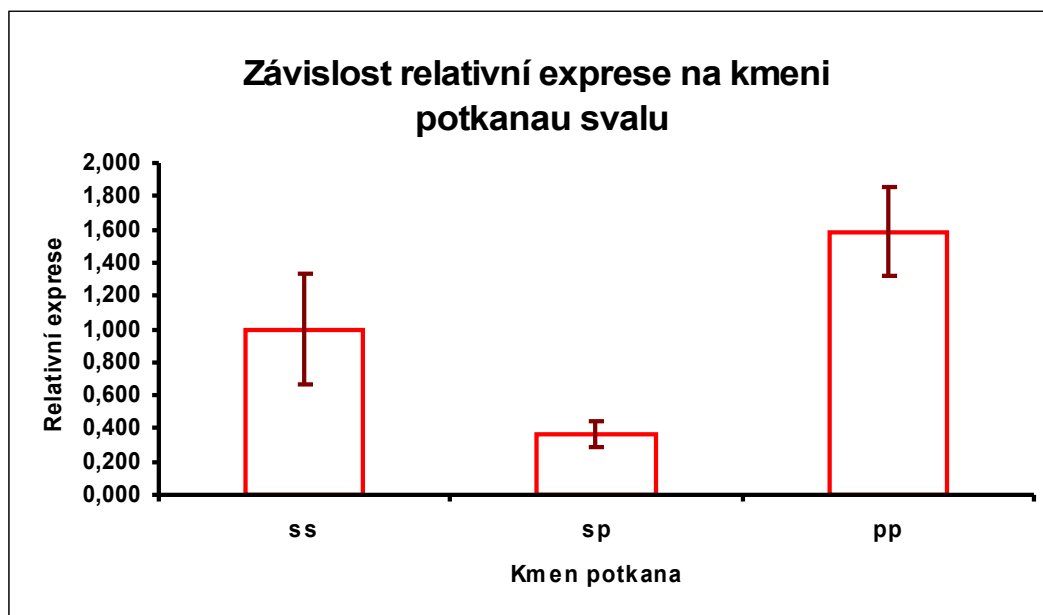


Graf č.16 - Míra exprese svalu u potkana starého jeden den u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Pif} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,03135$.

Míra exprese u jednotlivých kmenů 1.den - sval



Graf č.17 - Míra exprese srdce u potkana starého jeden den u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,00023$.



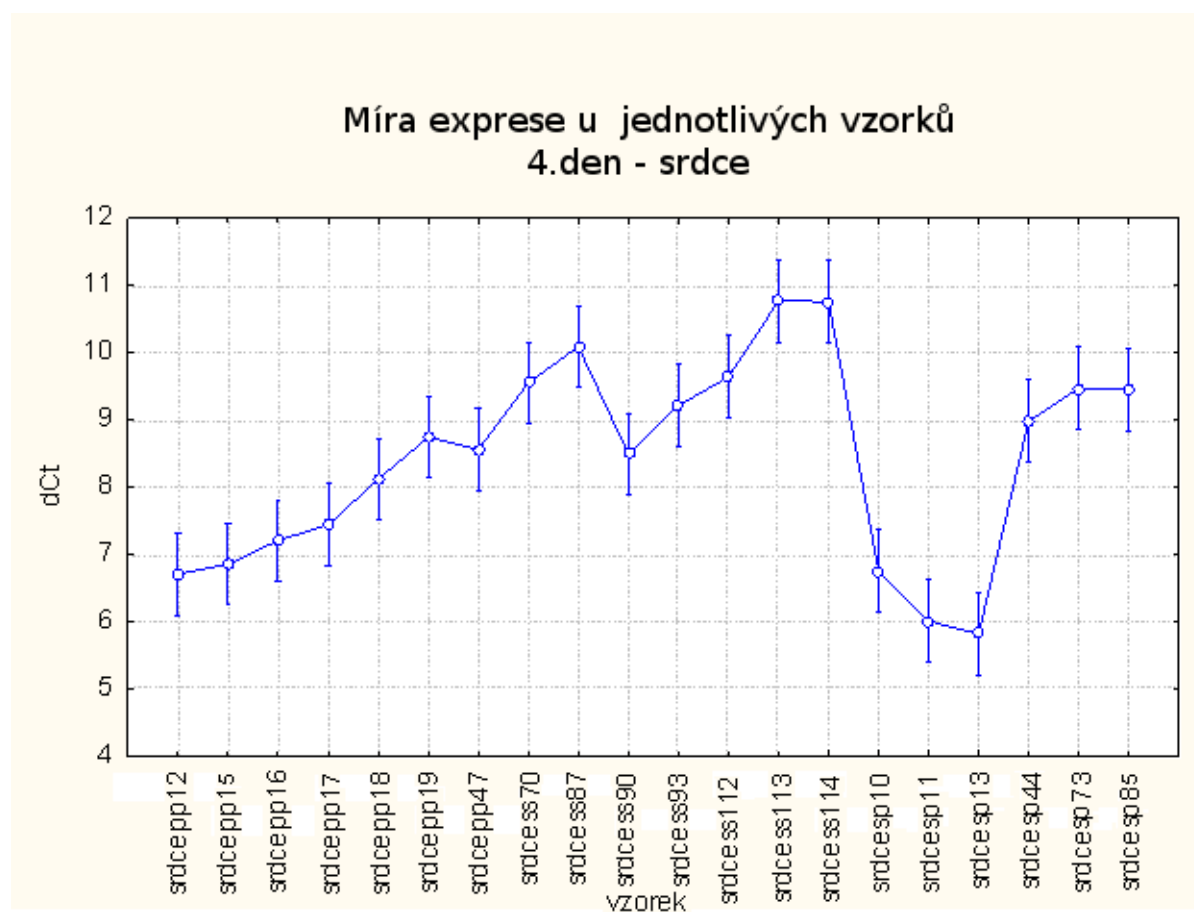
Graf č.18 - Relativní exprese srdce u potkana starého jeden den. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

U svalu potkana starého jeden den byla detekována vyšší exprese u heterozygotních potkanů, oproti kmenům SHR-Lx a SHR. Jednotlivé konfidenční intervaly se nepřekrývají a hladina významnosti testu je 0,00023. Výsledek lze označit za signifikantní.

4. den

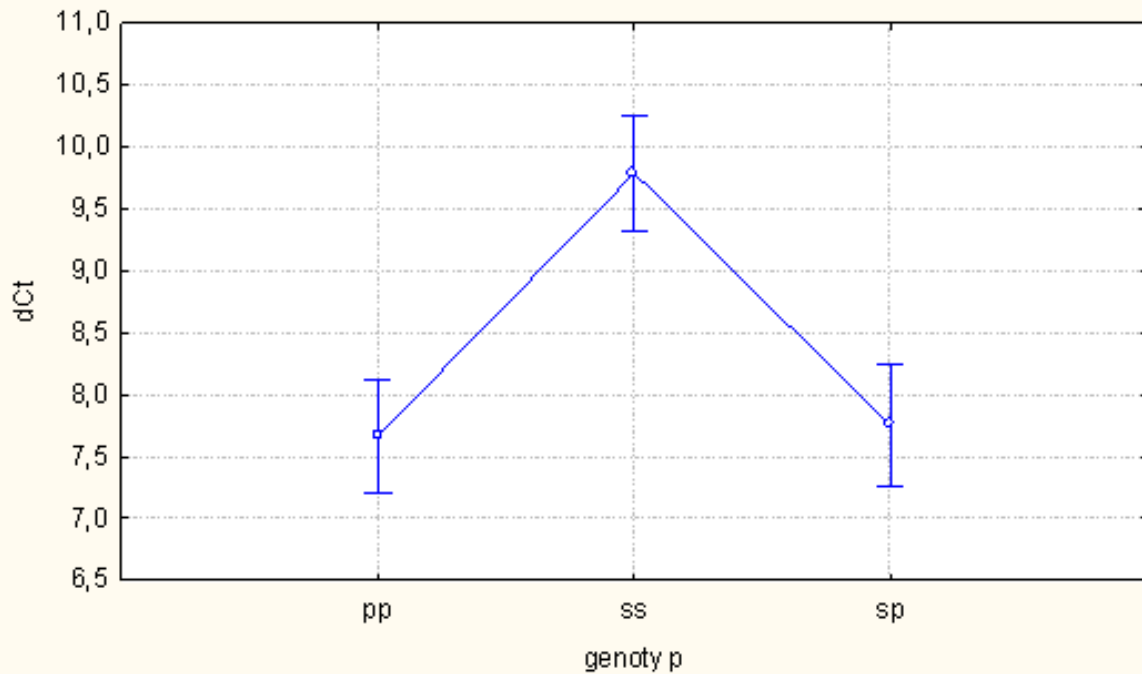
Po zpracování orgánů potkanů starých jeden den, jsem začala zpracovávat orgány potkanů starých čtyři dny. U každého orgánu jsem provedla reverzní transkripci s následnou Real-time PCR, stejně jako u předešlých vzorků. Výsledky jsem hodnotila v programu Statistica verze 8, metodou analýzy rozptylu vícenásobného třídění (two way ANOVA), s faktory genotyp a replikát.

Srdce

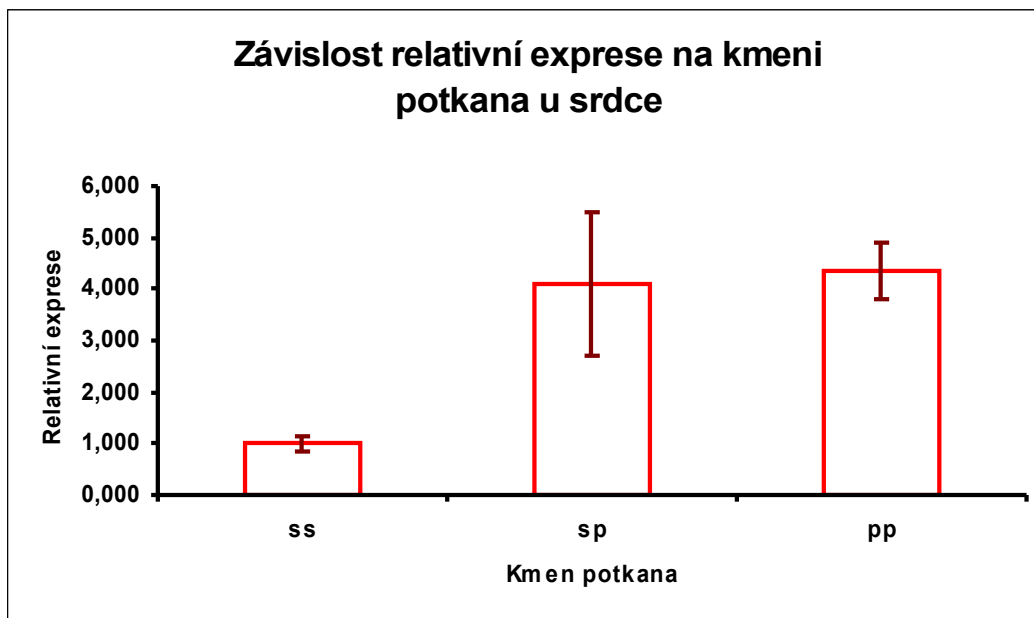


Graf č.19 - Míra exprese u srdce u potkana starého čtyři dny u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{PEf} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,00001$.

Míra exprese u jednotlivých kmenů 4.den - srdce



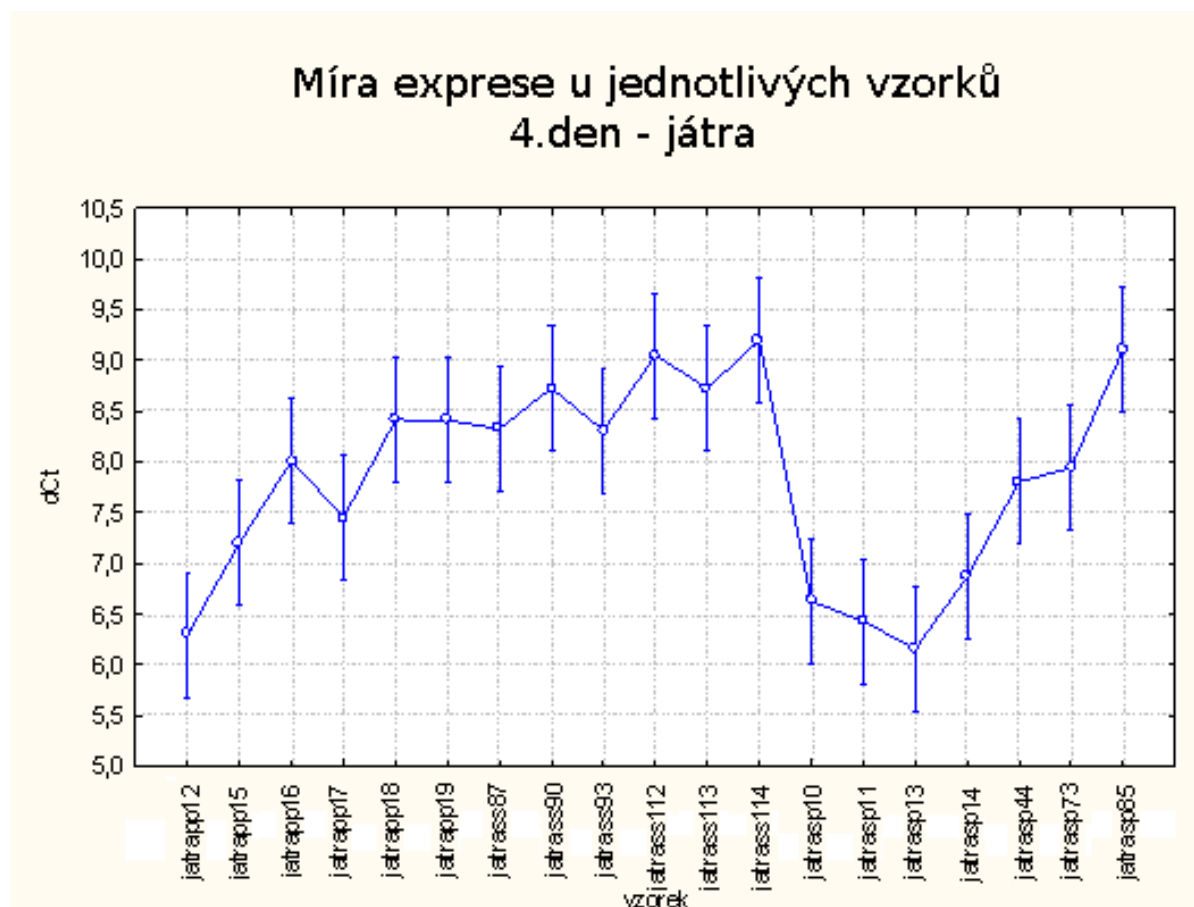
Graf č.20 - Míra exprese u srdce u potkana starého čtyři dny u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti = 0,00001.



Graf č.21 - Míra exprese srdce u potkana starého čtyři dny. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

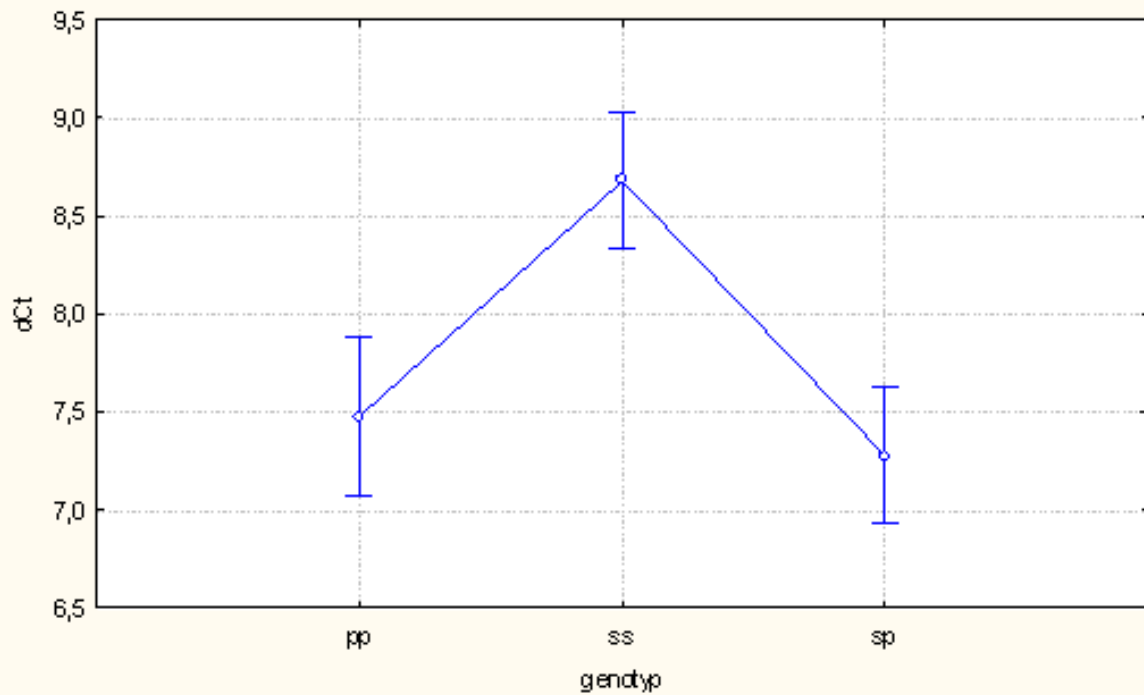
U srdce potkana starého čtyři dny, je prokazatelně nižší exprese u kmenu SHR oproti heterozygotům a kmeni SHR-Lx. Hladina významnosti testu je 0,0001, výsledek je možné označit za signifikantní.

Játra

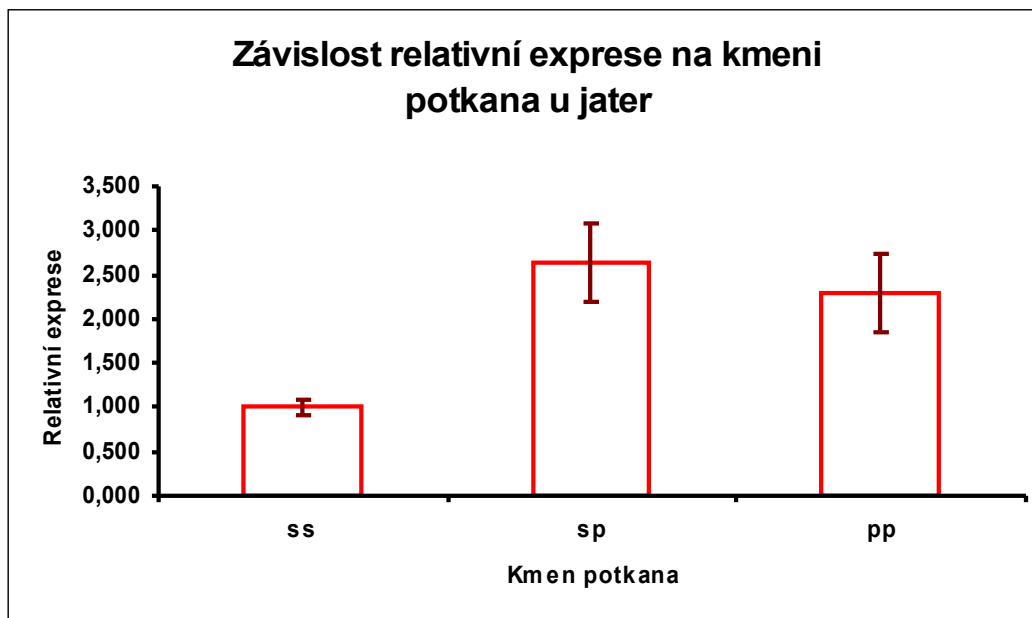


Graf č.22 - Míra exprese u jater u potkana starého čtyři dny u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,00001$.

Míra exprese u jednotlivých kmenů 4.den - játra



Graf č.23 - Míra exprese u jater u potkana starého čtyři dny u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti = 0,00001.



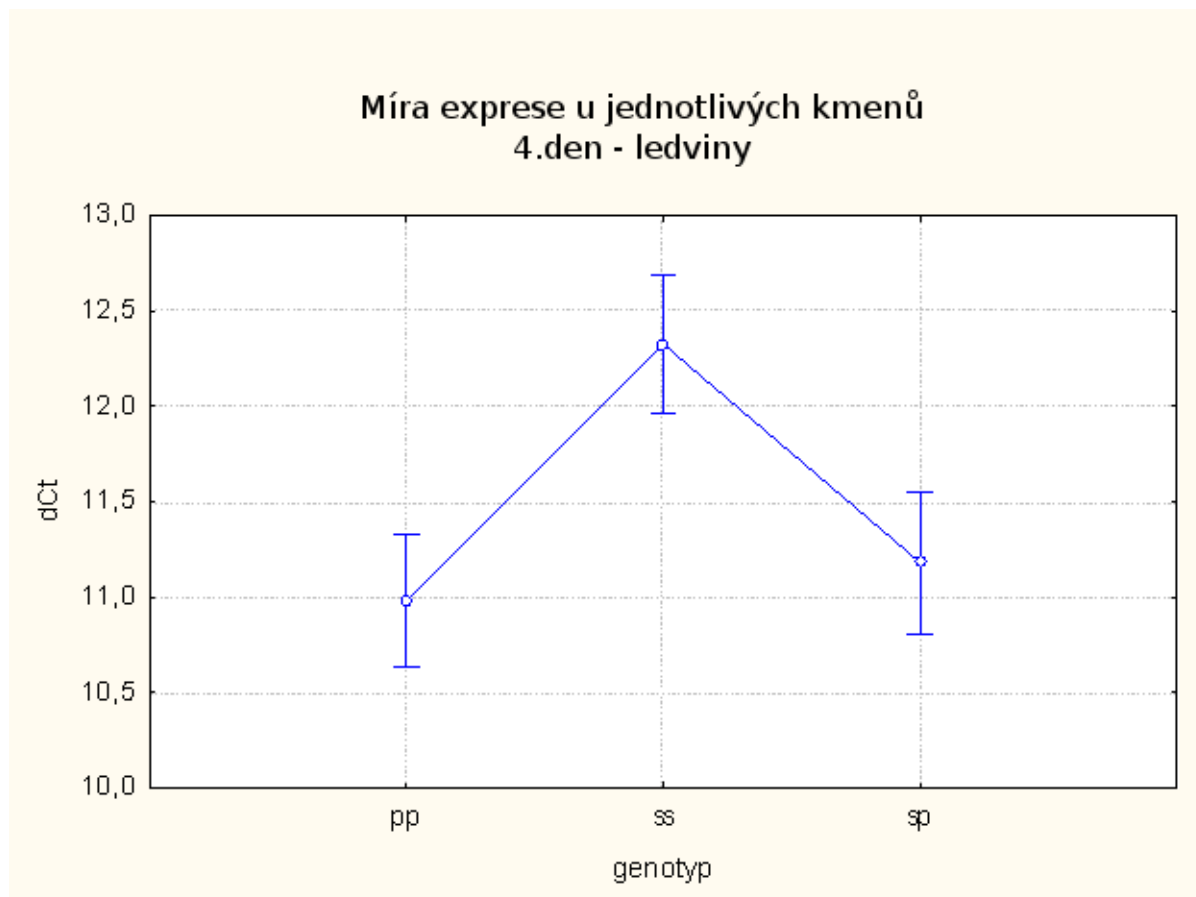
Graf č.24 - Míra exprese jater u potkana starého čtyři dny. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

U jater potkana starého čtyři dny, je prokazatelně nižší exprese u kmenu SHR oproti heterozygotům a kmeni SHR-Lx. Hladina významnosti testu je 0,00001, výsledek je možné označit za signifikantní.

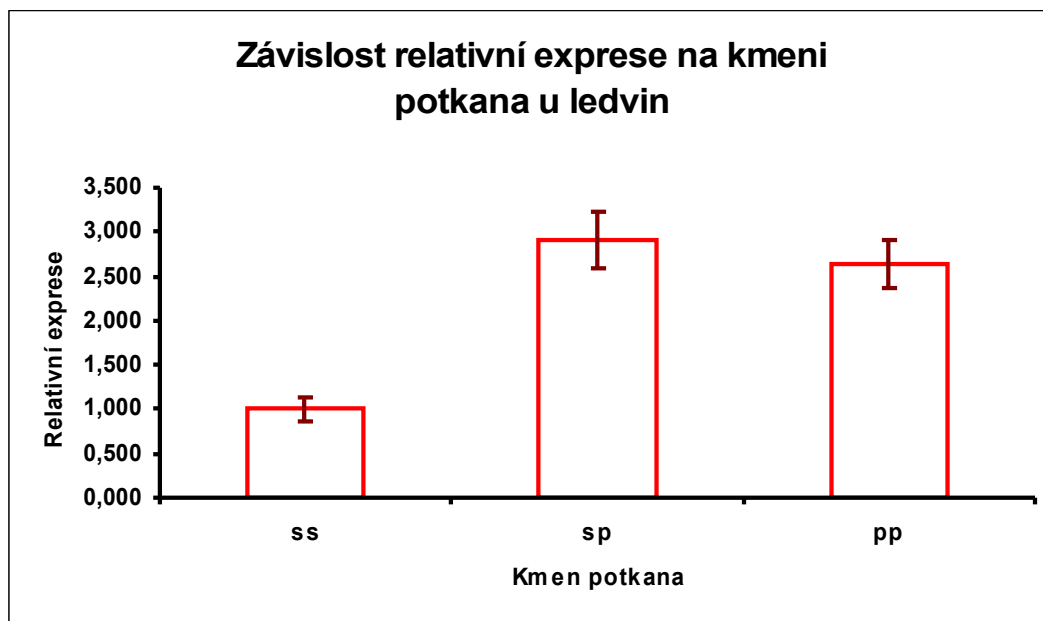
Ledviny



Graf č.25 - Míra exprese u ledvin u potkana starého čtyři dny u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,00001$.



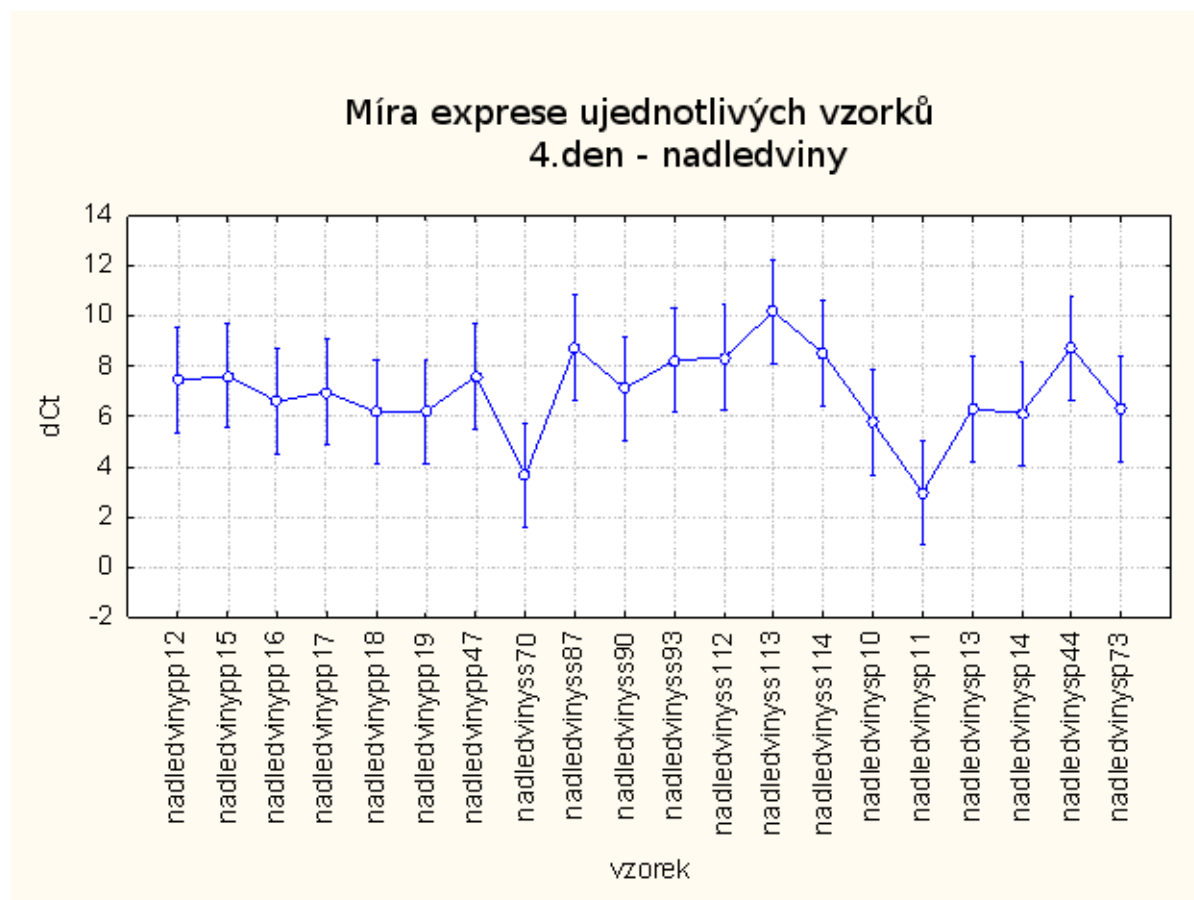
Graf č.26 - Míra exprese u ledvin u potkana starého čtyři dny u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,000001$.



Graf č.27 - Míra exprese ledvin u potkana starého čtyři dny. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

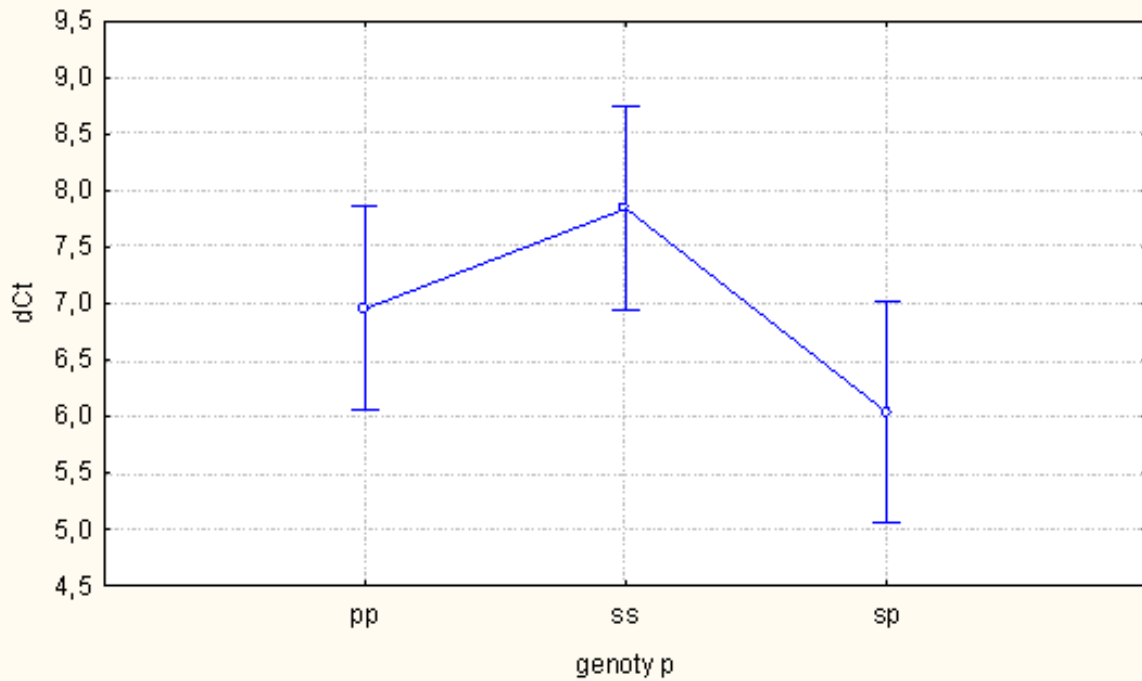
U ledvin potkana starého čtyři dny, je prokazatelně nižší exprese u kmenu SHR oproti Heterozygotům a kmeni SHR-Lx. Hladina významnosti testu je 0,000001, výsledek je možné označit za signifikantní.

Nadledviny



Graf č.28 - Míra exprese u nadledvin u potkana starého čtyři dny u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,00207$.

Míra exprese u jednotlivých kmenů 4. den - nadledviny



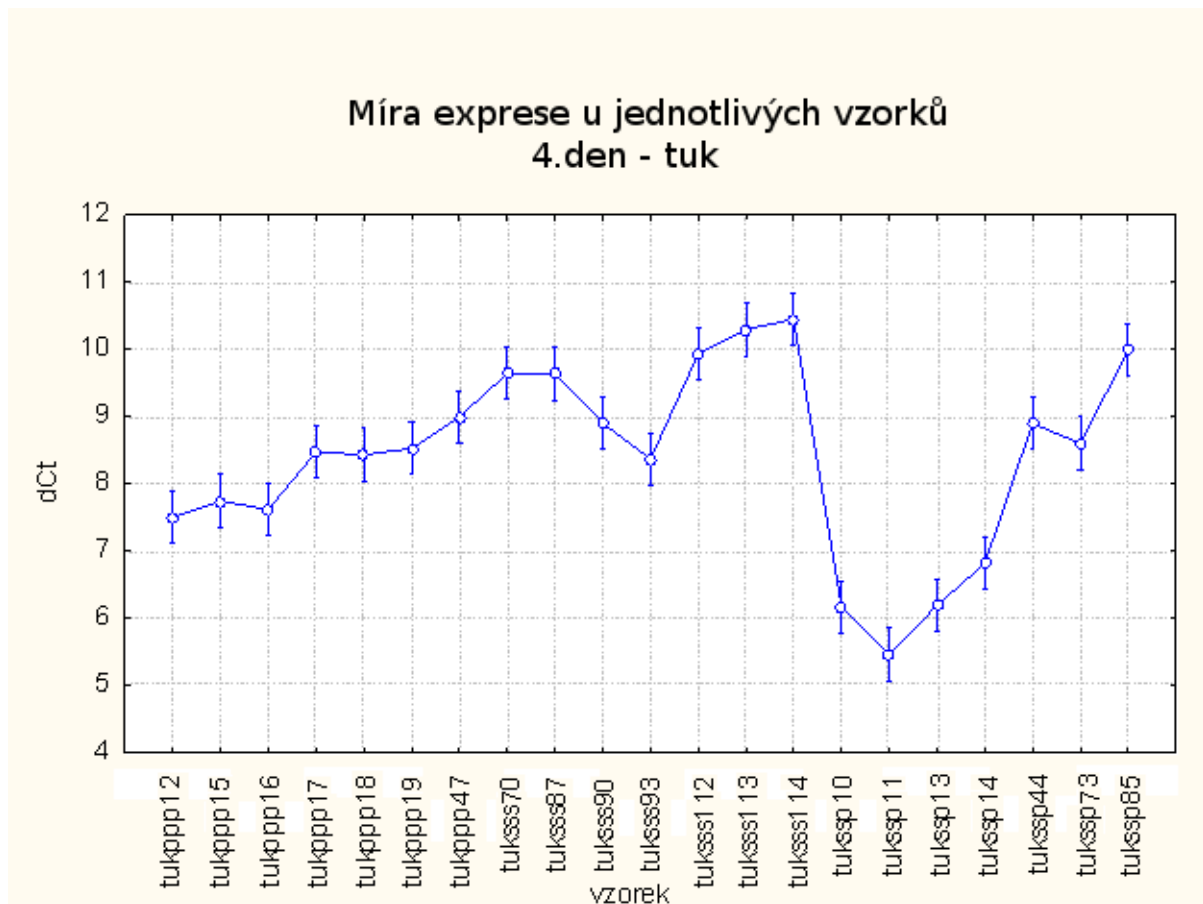
Graf č.29 - Míra exprese u nadledvin u potkana starého čtyři dny u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,02984$.



Graf č.30 - Míra exprese nadledvin u potkana starého čtyři dny. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

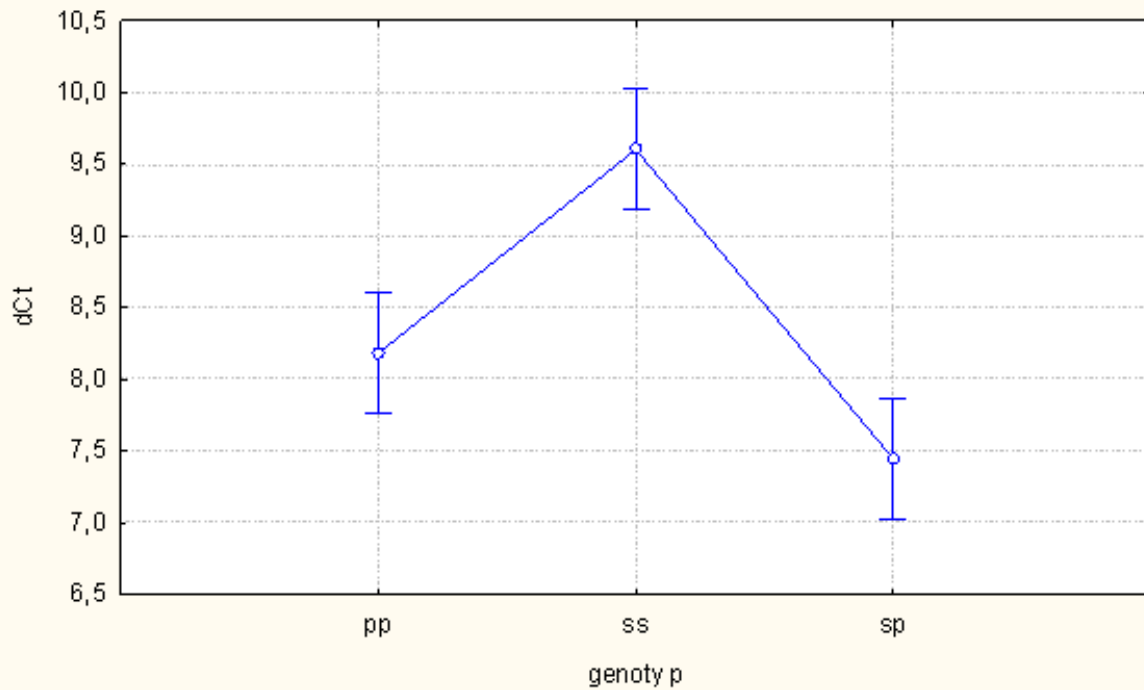
U nadledvin potkana starého čtyři dny, patrná nižší exprese u kmenu SHR oproti kmeni SHR-Lx a heterozygotům. Hladina významnosti testu je 0,02984, konfidenční intervaly porovnávaných kmenů se vzájemně překrývají. Výsledek tak není možné jednoznačně označit za signifikantní.

Tuk

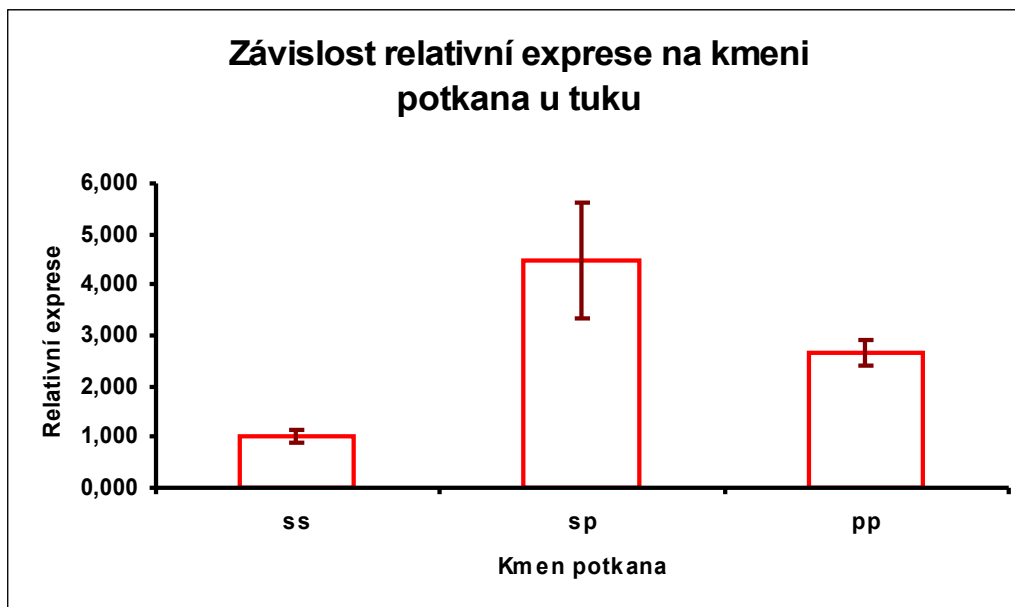


Graf č.31 - Míra exprese u hnědého tuku u potkana starého čtyři dny u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{P1cf} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,00001$.

Míra exprese u jednotlivých kmenů 4.den - tuk



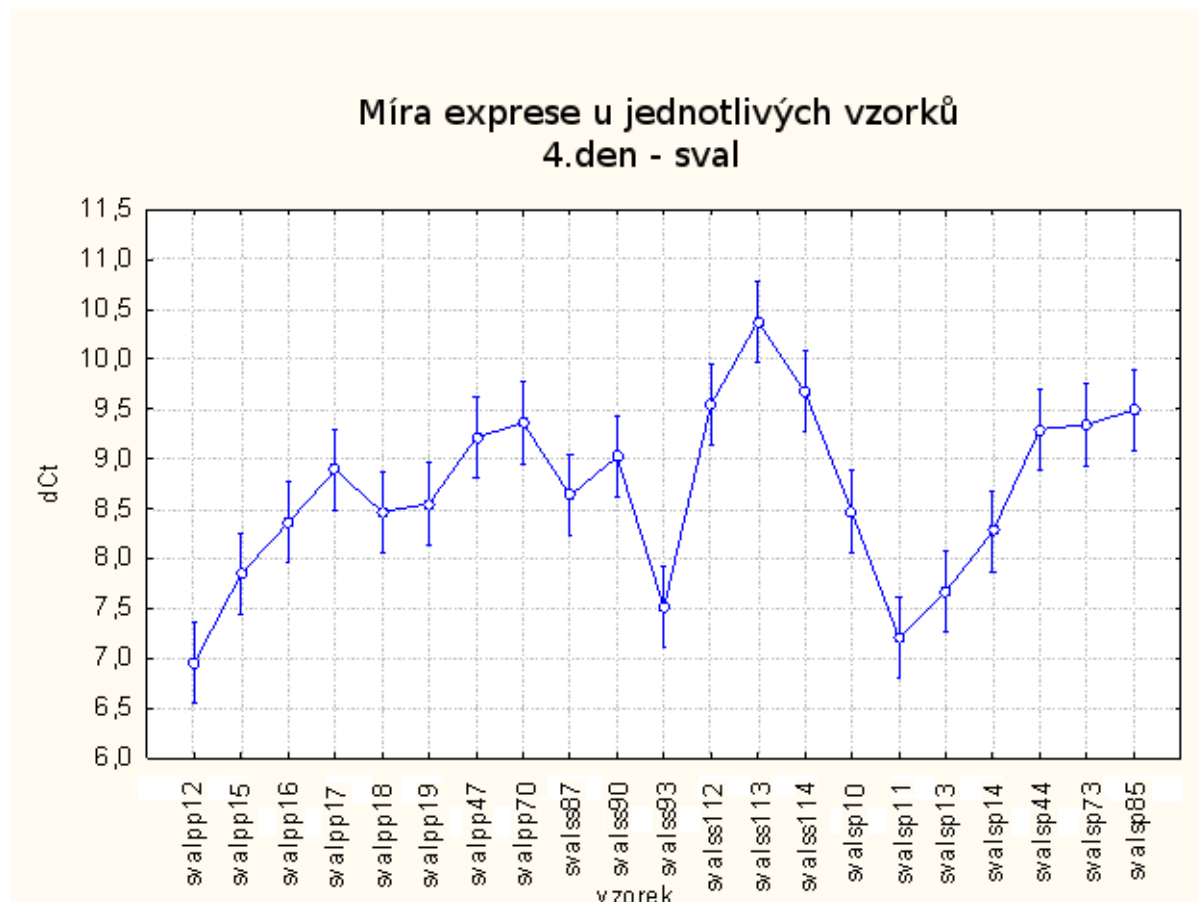
Graf č.32 - Míra exprese u hnědého tuku u potkana starého čtyři dny u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hkadina významnosti $p = 0,000001$.



Graf č.33 - Míra exprese tuku u potkana starého čtyři dny. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

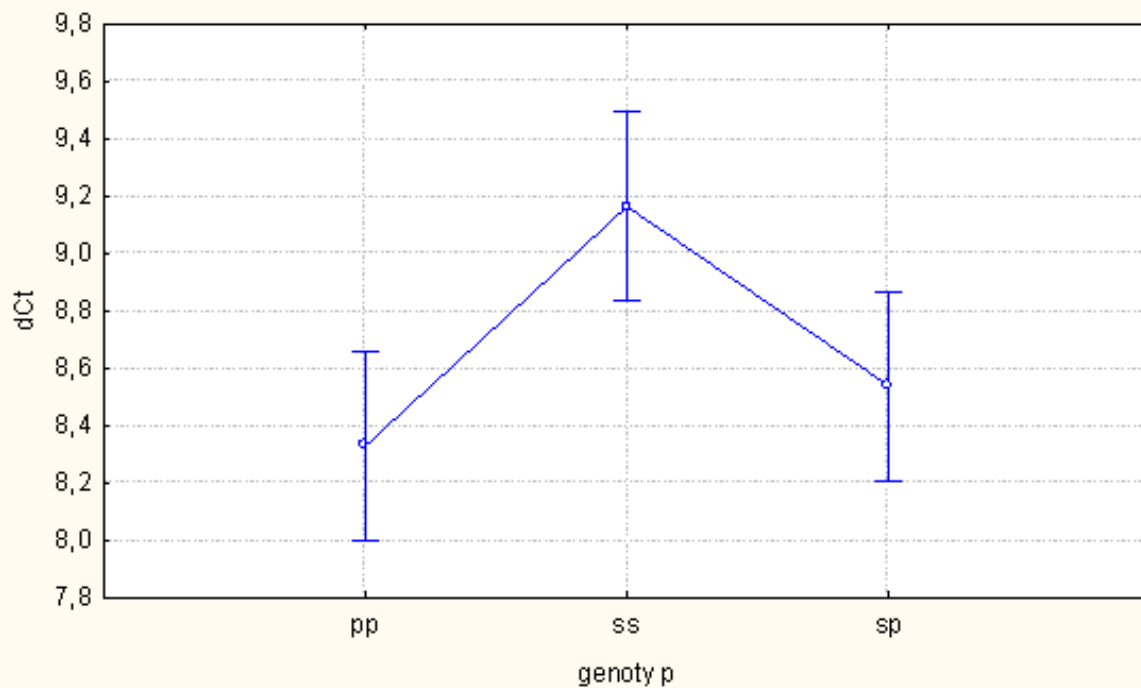
U hnědého tuku potkana starého čtyři dny, je prokazatelně nižší exprese u kmenu SHR oproti heterozygotům a kmeni SHR-Lx. Současně lze sledovat vyšší expresi kmene SHR-Lx oproti heterozygotům. Hladina významnosti testu je 0,000001, výsledek je možné označit za signifikantní.

Sval

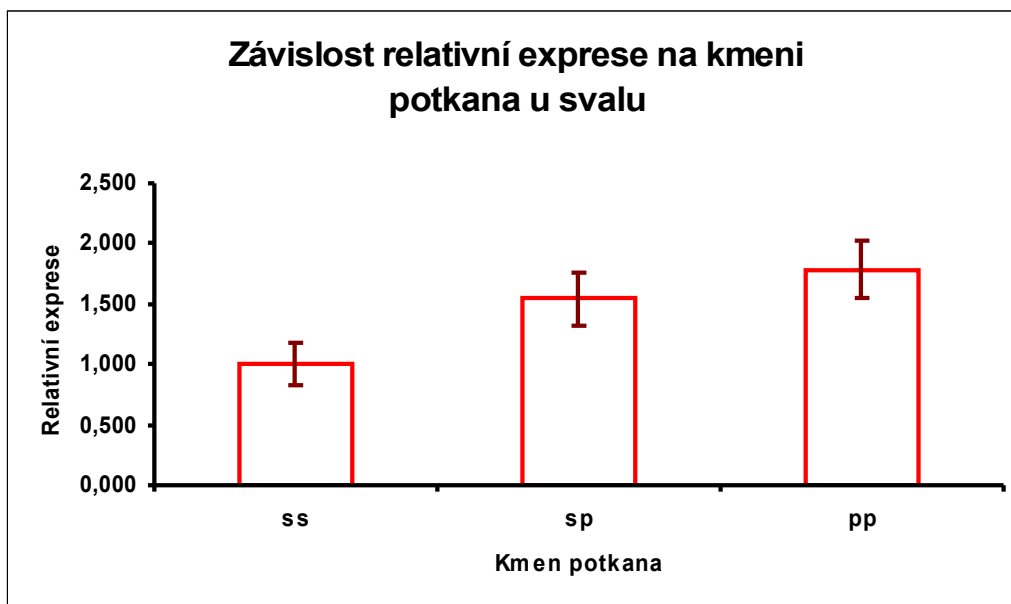


Graf č.34 - Míra exprese u svalu u potkana starého čtyři dny u jednotlivých vzorků. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a vzorek. Od každého kmene bylo zpracováno 7 vzorků. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,00001$.

Míra exprese u jednotlivých kmenů 4.den - sval



Graf č.35 - Míra exprese u svalů u potkana starého čtyři dny u jednotlivých kmenů. Zpracováno testem two way ANOVA, s faktory dCt ($Ct_{Plzf} - Ct_{gapdh}$) a genotyp. PP (SHR-Lx), SS (SHR – hypertenzní potkan), SP (heterozygot - jedna kopie chromosomu 8 pochází z SHR a druhá z SHR-Lx). Hladina významnosti $p = 0,0018$.



Graf č.36 – Míra exprese svalů u potkana starého čtyři dny. Arbitrární jednotky, exprese u SHR = 1.

U svalů potkana starého čtyři dny, je prokazatelně nižší exprese u kmenu SHR oproti heterozygotům a kmeni SHR-Lx. Hladina významnosti testu je 0,0018, výsledek je možné označit za signifikantní.

Diskuse

U potkanů starých 1 den je patrná vyšší exprese u srdce, ledvin, nadledvin a tuku u kmene SHR oproti kmenům SHR-Lx. Naproti tomu u jater není patrná vyšší exprese žádného z kmenů, což by mi mohl být výsledek nižší exprese *Plzf* v játrech. U srdce v prvním dni je kromě zvýšené exprese SHR oproti ostatním zkoumaným kmenům, také snižená exprese SHR-Lx oproti heterozygotům. Heterozygoti mají tedy střední úroveň exprese což ukazuje na aditivní účinek alely SHR.

Tyto výsledky podporují všechny výše uvedené teorie o funkci a regulaci *Plzf* v organismu. Zaprvé, že *Plzf* potlačuje expresi beta a gama epiteliálních sodíkových kanálů (ENaC) a tím snižuje resorpci sodíku. Zadruhé, že přímá interakce *Plzf* s AT2 angiotenzinovým receptorem ovlivňuje expresi p85 α PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase p85 α subunit). Tato dráha by mohla vysvětlit chybějící zvýšenou srdeční reakci u myši s chybějícím AT2. A zatřetí, že přímá interakce *Plzf* s reninovým receptorem vede ke zvýšené expresi p85 α PI3K. Navíc, stimulace reninu má proliferační a antiapoptotické účinky na kardiomyocyty potkana, které jsou zcela závislé na funkci *Plzf*. Toto by tedy mohlo být spojeno se srdeční hypertrofií, a nebo s fibrózou související s hypertenzí.

Všechny tyto výsledky, lze nejlépe reprodukovat právě u srdce potkana. Je pravděpodobné, že by tomu mohlo být z důvodu vyšší exprese *Plzf* v srdci. Jako další hypotézu bychom mohli vyslovit větší míru důležitosti signální dráhy srdeční. Hladina významnosti testu je však příliš vysoká, $p = 0,28074$, tudíž není možné výsledek označit za signifikantní. Stejně tak i výsledky v ostatních orgánech – ledvinách, nadledvinách a v tuku přesahují hladinu významnosti 0,01 a nelze je tedy považovat za signifikantní.

Srovnáme-li expresi jednotlivých orgánů, je velmi pravděpodobné, že regulace bude ve všech tkáních podobná. Jedinou výjimku tvoří sval. U svalu potkana starého jeden den, byla detekována vyšší exprese u heterozygotních potkanů, oproti kmenům SHR-Lx a SHR a dále vyšší exprese SHR oproti SHR-Lx. Jednotlivé konfidenční intervaly se nepřekrývají a hladina významnosti p je 0,00023. Tento účinek alely SHR-Lx by mohl být způsoben zkrácením tibie u potkanů, způsobené mutací Lx.

U potkanů starých 4 dny je výsledek obrácený než u předešlého dne. U všech zkoumaných orgánů – u srdce, jater, ledvin, nadledvin, tuku a svalu, je snížena exprese SHR, oproti stejně vysoké úrovni exprese u SHR-Lx a heterozygotů (dominantní účinek alely SHR-Lx). Ač je výsledek zcela opačný než jsme očekávali, vzhledem k zpracování vzorků testem two way ANOVA je lze označit za signifikantní. Konfidenční intervaly u jednotlivých genotypů se nepřekrývají a hladina významnosti p je nižší než 0,01. Za tento jev by mohl být zodpovědný sekundární efekt, u srdce např. projevení zátěže vysokým tlakem. Tyto možnosti nejsou příliš pravděpodobné, spíše by se daly přisoudit k odlišnému účinku *Plzf* na organismus. Jako další možnost lze považovat tyto výsledky pouze za výkyv, kdy se později situace navrátí do podobného stavu jako v 1. dni. Abychom mohly tuto hypotézu ověřit, je nutné prozkoumat expresi *Plzf* u starších potkanů. Nejvhodnější by bylo vytvořit časovou řadu, která bude navazovat na tyto výsledky z 1. a 4. dne.

Závěr

Během mého působení na ústavě genetiky, jsem se účastnila odběrů orgánů u potkanů starých jeden a čtyři dny. Odebírala jsem srdce, játra, ledviny, nadledviny, sval a tuk u kmenů SHR, SHR-Lx a u heterozygotních potkanů. Z odebraných vzorků se mi podařilo vyizolovat RNA a následně změřit její čistotu. U vzorků splňujících všechny podmínky dalšího zpracování, jsem zdárně provedla reverzní transkripci. U takto připravené cDNA jsem provedla Real-time PCR a to u sedmi vzorků z každého kmene. Reakci jsem u každého orgánu opakovala čtyřikrát. Výsledky jsem zpracovávala v programu Statistica verze 8. Použila jsem metodu analýzy rozptylu vícenásobného třídění (two way ANOVA), s faktory genotyp a replikát. Za signifikantní výsledek je možné považovat takový, u kterého hodnota dosažené hladiny významnosti (p) nepřekročila hodnotu 0,01. Zvolila jsem hodnotu nižší než 0,05, abych se vyhnula sporným výsledkům.

V této práci se mi podařilo prokázat, že u potkanů starých jeden den je patrná vyšší exprese u srdce, ledvin, nadledvin a tuku u kmene SHR oproti kmenům SHR-Lx a heterozygotům. Také je možné sledovat u srdce v prvním dni střední úroveň exprese

u heterozygotů, což ukazuje na aditivní účinek alely SHR. Tyto výsledky nesplnily stanovenou hodnotu hladiny významnosti (p), nelze je tedy považovat za signifikantní. Nicméně potvrzují vyslovené teorie o funkci a regulaci *Plzf* v organismu. Domnívám se, že pro potvrzení, by bylo vhodné pokus rozšířit o větší počet vzorků, nebo zařadit více replikátů. Další možností by bylo výsledky funkčně ověřit, např. pomocí transgenních potkanů.

U potkanů starých čtyři dny je výsledek opačný než u dne prvního. U všech zkoumaných orgánů – u srdce, jater, ledvin, nadledvin, tuku a svalů, je snižená exprese SHR, oproti SHR-Lx a heterozygotům. Navíc je zde možné pozorovat dominantní účinek alely SHR-Lx. Výsledky splnily stanovenou hodnotu hladiny významnosti $p < 0,01$, lze je tedy ve všech stanovovaných orgánech označit za signifikantní. Jelikož je výsledek naprosto opačný než jsme očekávali, bylo by vhodné pokračovat ve výzkumu starších potkanů, abychom mohli objasnit příčinu tohoto efektu.

Použitá literatura

- [1] ŠEDA, O., et al. Diabetologie : Genetika diabetu. Praha : Triton s.r.o., 2005. 421 s.
- [2] Lifton, R.P., Gharavi, A.G. & Geller, D.S. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104, 545-56 (2001).
- [3] Krushkal, J. et al. Genome-wide linkage analyses of systolic blood pressure using highly discordant siblings. *Circulation* 99, 1407-10 (1999).
- [4] Binder, A. A review of the genetics of essential hypertension. *Curr Opin Cardiol* 22, 176-84 (2007).
- [5] Rapp, J.P. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 80, 135-72 (2000).
- [6] Pravenec, M. et al. Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. *J.Clin.Invest.* 96, 1973-1978 (1995).
- [7] Pravenec, M. & Kurtz, T.W. Molecular genetics of experimental hypertension and the metabolic syndrome: from gene pathways to new therapies. *Hypertension* 49, 941-52 (2007).
- [8] KŘEN, V., et al. Genetic isolation of a region of chromosome 8 that exerts major effects on blood pressure and cardiac mass in the spontaneously hypertensive rat.. *The Journal of clinical investigation.* . 1997, no. 4, s. 577-581.
- [9] ŠEDA, O., et al. Region of rat chromosome 8 determines complex nutrigenetic interactions under conditions of sucrose and cholesterol diets.. *Prague medical report.* 2006, no. 2, s. 251-260.
- [10] ŠEDA, O., et al. A 14-gene region of rat chromosome 8 in SHR-derived polydactylous congenic substrain affects muscle-specific insulin resistance, dyslipidaemia and visceral adiposity. *Folia biologica.* 2005, no. 3, s. 53-61.
- [11] VRÁNA , A., et al. Triglyceridemia, glucoregulation, and blood pressure in various rat strains : Effects of dietary carbohydrates.. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1993, no. 683, s. 57-68.

[12] ŠEDOVIÁ, L., et al. Rat inbred PD/cub strain as a model of dyslipidemia and insulin resistance. *Folia biologica*. 2006, no. 3, s. 99-106.

[13] Liska, F. et al. Deletion of a conserved noncoding sequence in Plzf intron leads to Plzf down-regulation in limb bud and polydactyly in the rat. *Dev Dyn* 238, 673-84 (2009).

[14] THOMPSON, AJ, SULLIVAN, NL, LUMMIS, SC. Characterization of 5-HT3 receptor mutations identified in schizophrenic patients. *J Mol Neurosci*. 2006, no. 3, s. 273-81.

[15] KRZYWKOWSKI, K. Do polymorphisms in the human 5-HT3 genes contribute to pathological phenotypes?. *Biochem Soc Trans.* . 2006, no. 5, s. 872-5.

[16] NIESLER, B., et al. Serotonin receptor genes HTR3A and HTR3B are not involved in Gilles de la Tourette syndrome.. *Psychiatr Genet.* . 2005, no. 4, s. 303-304.

[17] HAYES, MR., et al. Serotonin type-3 receptors mediate cholecystokinin-induced satiation through gastric distension. . *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006, no. 1, s. 115-23.

[18] HAYES, MR, COVASA, M. Hindbrain 5-HT3 receptors participate in control of meal size and mediate CCK-induced satiation.. *Brain Res*. 2006, no. 1, s. 99-107.

[19] CARVALHO, F., et al. Hyperglycemia induced by pharmacological activation of central serotonergic pathways depends on the functional integrity of brain CRH system and 5-HT3 receptors. *Horm. Metab. Res*. 2005, no. 8, s. 482-8.

[20] Chen, Z. et al. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute

[21] Li, J.Y. et al. Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J. Biol. Chem.* 272, 22447-55 (1997).

[22] Martin, P.J., Delmotte, M.H., Formstecher, P. & Lefebvre, P. PLZF is a negative regulator of retinoic acid receptor transcriptional activity. *Nuclear receptor* 1, 6 (2003).

[23] Barna, M., Hawe, N., Niswander, L. & Pandolfi, P.P. Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat. Genet.* 25, 166-72 (2000).

[24] Buaas, F.W. et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* 36, 647-52 (2004).

[25] Costoya, J.A. et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet.* 36, 653-9 (2004).

[26] Naray-Fejes-Toth, A., Boyd, C. & Fejes-Toth, G. Regulation of epithelial sodium transport by promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F18-26 (2008).

[27] Senbonmatsu, T. et al. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J.* 22, 6471-82 (2003).

[28] Schefe, J.H. et al. A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circulation research* 99, 1355-66 (2006).

[29] HALUZÍK, Martin, SVAČINA, Štěpán. *Metabolický syndrom a nukleární receptory PPAR.* Praha : Grada Publishing, 2005. 214 s.

[30] KARBEČNÁ , Marie. *Aplikace molekulární genetiky v klinické praxi.* Nakladatelství Karolinum Praha 1, Ovocný trh 3, Praha : Univezsita Karlova, 1999. 128 s.

[31] KOČÁREK, Eduard. *Genetika.* Radimova 37/50, 169 00, Praha 6 : Scientia, spol. s.r.o., pedagogické nakladatelství , 2004. 355 s.

[32] OTOVÁ, Berta, SOUKUP, František. *Biologie člověka pro bakalářské studium na lékařských fakultách : Základy genetiky.* Prahy 1, Ovocný trh 3, Praha : Karolinum - nakladatelství University Karlovy, 1997. 102 s.

[33] SLÁMOVÁ, Petra, *Bakalářská práce, Identifikace genetických determinant inzulínové rezistence pomocí srovnávacího sekvenování genů,* Praha 2007.

Přílohy

Příloha č.1 - Tabulka odběrů:

číslo	pohlaví	kmen	genotyp	srdce	játra – část	ledviny	nadledviny	hnědý tuk	sval – lýtko	hmotnost	porod	odběr	den
1	samec	SHR.Ix PD5	PP	0,0344	0,1024	0,0673	0,0024	0,0307	0,0087	5,43	22.9.2009	23.9.2009	1
2	samec	SHR.Ix PD5	PP	0,0291	0,0958	0,0578	0,0017	0,0201	0,0079	4,44	22.9.2009	23.9.2009	1
3	samec	SHR.Ix PD5	PP	0,0380	0,1591	0,0633	0,0016	0,0269	0,0091	5,34	22.9.2009	23.9.2009	1
4	samec	SHR.Ix PD5	PP	0,0290	0,1402	0,0540	0,0017	0,0282	0,0075	4,15	22.9.2009	23.9.2009	1
5	samec	SHR.Ix PD5	PP	0,0311	0,1427	0,0655	0,0019	0,0357	0,0097	5,06	22.9.2009	23.9.2009	1
6	samec	SHR.Ix PD5	PP	0,0296	0,1321	0,0457	0,0019	0,0151	0,0059	3,79	22.9.2009	23.9.2009	1
7	samec	SHR	SS	0,0610	0,1572	0,0723	0,0024	0,0233	0,0117	6,40	22.9.2009	23.9.2009	1
8	samec	SHR	SS	0,0606	0,1318	0,0590	0,0027	0,0201	0,0162	5,15	22.9.2009	23.9.2009	1
9	samec	SHR	SS	0,0457	0,1560	0,0751	0,0023	0,0163	0,0078	4,88	22.9.2009	23.9.2009	1
10	samec	F4 IC (SHRxPD5)	SP	0,0427	0,0879	0,0901	0,0025	0,0308	0,0107	6,55	27.9.2009	1.10.2009	4
11	samec	F4 IC (SHRxPD5)	SP	0,0573	0,1230	0,0951	0,0026	0,0287	0,0144	6,60	27.9.2009	1.10.2009	4
12	samec	F4 IC (SHRxPD5)	PP	0,0546	0,1078	0,0948	0,0032	0,0304	1,0160	7,01	27.9.2009	1.10.2009	4
13	samec	F4 IC (SHRxPD5)	SP	0,0612	0,1512	0,0892	0,0033	0,0318	0,0123	6,45	27.9.2009	1.10.2009	4
14	samec	F4 IC (SHRxPD5)	SP	0,0590	0,1317	0,0910	0,0022	0,0377	0,0194	6,86	27.9.2009	1.10.2009	4
15	samec	F4 IC (SHRxPD5)	PP	0,0540	0,1312	0,0865	0,0018	0,0288	0,0210	6,51	27.9.2009	1.10.2009	4
16	samec	F4 IC (SHRxPD5)	PP	0,0520	0,1103	0,0855	0,0015	0,0312	0,0205	6,40	27.9.2009	1.10.2009	4
17	samec	F4 IC (SHRxPD5)	PP	0,0497	0,1526	0,0895	0,0023	0,0295	0,0235	6,86	27.9.2009	1.10.2009	4
18	samec	F4 IC (SHRxPD5)	PP	0,0501	0,1432	0,0844	0,0020	0,0355	0,0139	6,26	27.9.2009	1.10.2009	4
19	samec	F4 IC (SHRxPD5)	PP	0,0517	0,1456	0,0790	0,0016	0,0278	0,0133	6,03	27.9.2009	1.10.2009	4

26	samec	F4 IC (SHRxD5)	XX	0,0389	0,1383	0,0592	0,0017	0,0388	0,0083	5,45	8.10.2009	9.10.2009	1
27	samec	F4 IC (SHRxD5)	XX	0,0446	0,1749	0,0705	0,0022	0,0521	0,0118	6,16	8.10.2009	9.10.2009	1
28	samec	F4 IC (SHRxD5)	XX	0,0355	0,1663	0,0613	0,0030	0,0431	0,0145	5,12	8.10.2009	9.10.2009	1
29	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0395	0,1561	0,0707	0,0013	0,0453	0,0085	6,13	8.10.2009	9.10.2009	1
30	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0498	0,1521	0,0608	0,0018	0,0439	0,0162	5,55	8.10.2009	9.10.2009	1
41	samec	F4 IC (SHRxD5)	PP	0,0537	0,1596	0,1104	0,0024	0,0263	0,0148	8,20	10.10.2010	14.10.2009	4
42	samec	F4 IC (SHRxD5)	PP	0,0572	0,1751	0,1169	0,0022	0,0399	0,0142	8,67	10.10.2009	14.10.2009	4
43	samec	F4 IC (SHRxD5)	PP	0,0575	0,1622	0,1095	0,0026	0,0356	0,0185	8,28	10.10.2009	14.10.2009	4
44	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0503	0,1722	0,1038	0,0028	0,0357	0,0183	7,36	10.10.2009	14.10.2009	4
45	samec	F4 IC (SHRxD5)	PP	0,0611	0,1853	0,1216	0,0028	0,0388	0,0115	8,70	10.10.2009	14.10.2009	4
46	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0526	0,0956	0,1085	0,0030	0,0295	0,0127	7,39	10.10.2009	14.10.2009	4
47	samec	F4 IC (SHRxD5)	PP	0,0521	0,1695	0,1069	0,0027	0,0364	0,0100	7,35	10.10.2009	14.10.2009	4
48	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0269	0,1388	0,0658	0,0025	0,0287	0,0074	5,30	14.10.2009	15.10.2009	1
49	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0319	0,1397	0,0644	0,0033	0,0212	0,0069	5,10	14.10.2009	15.10.2009	1
50	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0389	0,1697	0,0641	0,0026	0,0347	0,0107	4,85	14.10.2009	15.10.2009	1
51	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0304	0,1435	0,0572	0,0020	0,0345	0,0124	5,10	14.10.2009	15.10.2009	1
52	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0304	0,1459	0,0708	0,0023	0,0354	0,0125	5,23	14.10.2009	15.10.2009	1
53	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0302	0,1525	0,0528	0,0023	0,0281	0,0142	5,08	14.10.2009	15.10.2009	1
54	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0292	0,1711	0,0643	0,0027	0,0298	0,0071	5,02	14.10.2009	15.10.2009	1

55	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0257	0,1298	0,0484	0,0016	0,0213	0,0135	4,07	14.10.2009	15.10.2009	1
56	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0309	0,2014	0,0615	0,0021	0,0399	0,0104	5,09	14.10.2009	15.10.2009	1
61	samec	F4 IC (SHRxD5)	PP	0,0292	0,1318	0,0558	0,0022	0,0328	0,0060	4,96	4.11.2009	5.11.2009	1
62	samec	F4 IC (SHRxD5)	PP	0,0262	0,1519	0,0624	0,0021	0,0304	0,0060	5,25	4.11.2009	5.11.2009	1
63	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0274	0,1689	0,0628	0,0024	0,0371	0,0067	5,40	4.11.2009	5.11.2009	1
64	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0329	0,1387	0,0705	0,0020	0,0378	0,0027	5,56	4.11.2009	5.11.2009	1
65	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0295	0,1256	0,0627	0,0017	0,0313	0,0064	5,26	4.11.2009	5.11.2009	1
66	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0298	0,1219	0,0613	0,0023	0,0305	0,0067	5,11	4.11.2009	5.11.2009	1
70	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0316	0,1361	0,0825	0,0023	0,0239	0,0122	5,99	6.11.2009	10.11.2009	4
71	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0335	0,1737	0,0768	0,0025	0,0296	0,0091	5,88	6.11.2009	10.11.2009	4
72	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0307	0,1723	0,0715	0,0022	0,0216	0,0177	5,15	6.11.2009	10.11.2009	4
73	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0310	0,1668	0,0667	0,0032	0,0291	0,0179	5,91	6.11.2009	10.11.2009	4
79	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0329	0,1208	0,0814	0,0016	0,0225	0,2280	5,52	16.11.2009	20.11.2009	4
80	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0291	0,1455	0,0956	0,0240	0,0237	0,0126	6,09	16.11.2009	20.11.2009	4
81	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0454	0,1552	0,0993	0,0024	0,0241	0,0159	6,53	20.11.2009	24.11.2009	4
82	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0450	0,1812	0,1020	0,0019	0,0323	0,0125	7,04	20.11.2009	24.11.2009	4
83	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0392	0,1978	0,0932	0,0024	0,0251	0,0107	6,83	20.11.2009	24.11.2009	4
84	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0416	0,1543	0,0926	0,0017	0,0223	0,0051	6,19	28.11.2009	2.12.2009	4
85	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0436	0,1486	0,1042	0,0022	0,0284	0,0078	7,65	28.11.2009	2.12.2009	4

86	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0385	0,1552	0,1014	0,0021	0,0296	0,0086	7,01	28.11.2009	2.12.2009	4
87	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0458	0,1440	0,0978	0,0024	0,0305	0,0088	6,58	28.11.2009	2.12.2009	4
88	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0536	0,1291	0,0979	0,0020	0,0253	0,0079	6,68	28.11.2009	2.12.2009	4
89	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0332	0,1140	0,0910	0,0025	0,0240	0,0052	6,58	28.11.2009	2.12.2009	4
90	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0289	0,1336	0,0747	0,0021	0,0183	0,0063	4,85	29.11.2009	3.12.2009	4
91	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0278	0,1341	0,0752	0,0021	0,0246	0,0038	5,52	29.11.2009	3.12.2009	4
92	samec	F4 IC (SHRxD5)	SP	0,0328	0,1562	0,0780	0,0016	0,0236	0,0086	5,90	29.11.2009	3.12.2009	4
93	samec	F4 IC (SHRxD5)	SS	0,0255	0,1285	0,0620	0,0014	0,0127	0,0098	4,03	29.11.2009	3.12.2009	4
112	samec	SHR	SS	0,0510	0,1550	0,1131	0,0031	0,0316	0,0160	7,63	3.12.2009	7.12.2009	4
113	samec	SHR	SS	0,0523	0,1636	0,1121	0,0028	0,0299	0,0238	7,40	3.12.2009	7.12.2009	4
114	samec	SHR	SS	0,0495	0,1635	0,1151	0,0030	0,0340	0,0211	7,54	3.12.2009	7.12.2009	4

Příloha č.2 - Tabulka transkripce 1.den:

1 DEN – transkripce											přídavek vody
µg/mL RNA	260/280	260/230	A230	A260	A280	A320	dilution		RNA ng/ul	kmen	na 20ul RNA
31,3	1,8	2,360	0,331	0,782	0,433	0,001	30	srdce1	939	PP	33,66
30,8	1,85	2,080	0,370	0,769	0,416	0,001	30	srdce2	924	PP	32,80
32,4	1,81	2,300	0,352	0,810	0,447	0,000	30	srdce3	972	PP	35,54
31,8	1,83	2,130	0,374	0,796	0,436	0,004	30	srdce4	954	PP	34,51
31,8	1,78	2,170	0,365	0,794	0,446	0,001	40	srdce5	1272	PP	52,69
32,7	1,88	2,300	0,356	0,818	0,435	0,001	20	srdce61	654	PP	17,37
32,9	1,36	1,280	0,640	0,823	0,606	0,389	20	srdce62	658	PP	17,60
37	1,84	2,390	0,388	0,926	0,504	0,000	30	srdce7	1110	SS	43,43
28,9	1,84	2,350	0,306	0,721	0,392	0,000	30	srdce8	867	SS	29,54
34,3	1,86	2,200	0,390	0,858	0,461	0,001	30	srdce9	1029	SS	38,80
38,8	1,91	1,500	0,649	0,971	0,509	0,003	20	srdce50	776	SS	24,34
22,9	1,86	0,560	1,023	0,573	0,309	0,003	20	srdce53	458	SS	6,17
20,2	1,79	2,070	0,244	0,504	0,282	0,003	40	srdce55	808	SS	26,17
10,8	1,72	2,250	0,120	0,269	0,156	0,003	40	srdce63	432	SS	4,69
102,6	1,84	2,270	1,132	2,564	1,392	0,004	20	srdce30	2052	SP	97,26
18,2	1,86	0,700	0,649	0,455	0,245	0,009	20	srdce48	364	SP	0,80
23,1	1,78	2,150	0,268	0,577	0,324	0,004	40	srdce49	924	SP	32,80
23,5	1,84	1,320	0,444	0,587	0,319	0,008	20	srdce51	470	SP	6,86
38,5	1,86	2,270	0,424	0,963	0,517	0,006	20	srdce54	770	SP	24,00
27,5	1,82	1,690	0,407	0,687	0,378	0,006	40	srdce56	1100	SP	42,86
31,2	1,91	2,150	0,363	0,781	0,409	0,008	20	srdce66	624	SP	15,66
38,3	1,73	2,440	0,392	0,957	0,552	0,001	130	játra1	4979	PP	179,16
26,1	1,7	2,400	0,271	0,651	0,383	0,002	151	játra2	3941,1	PP	137,64
18,8	1,68	2,350	0,200	0,470	0,280	0,002	151	játra3	2838,8	PP	93,55
8,5	1,61	2,210	0,097	0,214	0,133	0,001	151	játra4	1283,5	PP	31,34
26,7	1,73	2,340	0,285	0,667	0,387	0,003	151	játra5	4031,7	PP	141,27
13,2	1,65	2,410	0,137	0,331	0,201	0,002	200	játra61	2640	PP	85,60
19,1	1,67	2,390	0,200	0,477	0,285	0,003	200	játra62	3820	PP	132,80
29,9	1,85	2,030	0,368	0,747	0,402	0,000	60	játra7	1794	SS	51,76
34,8	1,81	2,210	0,393	0,870	0,482	0,000	60	játra8	2088	SS	63,52
34,7	1,75	2,390	0,363	0,869	0,496	0,001	120	játra9	4164	SS	146,56
17,4	1,71	2,130	0,205	0,435	0,254	0,002	200	jatra50	3480	SS	119,20
39,2	1,75	2,340	0,418	0,979	0,560	0,005	200	jatra53	7840	SS	293,60
23,8	1,62	2,420	0,245	0,595	0,366	0,004	400	jatra55	9520	SS	360,80
21,5	1,7	2,400	0,224	0,538	0,315	0,005	200	játra63	4300	SS	152,00
23,1	1,61	2,380	0,243	0,577	0,358	0,005	400	jatra30	9240	SP	349,60
13,2	1,66	1,790	0,185	0,331	0,200	0,004	200	jatra48	2640	SP	85,60
20,3	1,69	2,010	0,253	0,508	0,300	0,005	200	jatra49	4060	SP	142,40
15,8	1,64	1,740	0,227	0,395	0,241	0,004	200	jatra51	3160	SP	106,40
25,9	1,7	2,360	0,274	0,647	0,381	0,005	200	jatra54	5180	SP	187,20
35,5	1,74	2,330	0,380	0,886	0,510	0,007	200	jatra56	7100	SP	264,00
21,1	1,66	2,410	0,219	0,528	0,318	0,006	200	játra66	4220	SP	148,80

koncentrace srdce 350 ng/ul
koncentrace játra 500 ng/ul

1 DEN –transkripce											přídavek vody
µg/mL RNA	260/280	260/230	A230	A260	A280	A320	dilution		RNA ng/ul	kmen	na 20ul RNA
31,7	1,73	2,400	0,330	0,793	0,459	0,003	45	ledviny1	1426,5	PP	37,06
32,4	1,79	2,190	0,370	0,810	0,454	0,002	45	ledviny2	1458	PP	38,32
29,3	1,72	2,400	0,305	0,734	0,426	0,001	45	ledviny3	1318,5	PP	32,74
32,5	1,78	2,360	0,345	0,813	0,457	0,001	45	ledviny4	1462,5	PP	38,5
37,8	1,71	2,390	0,396	0,945	0,552	0,003	90	ledviny5	3402	PP	116,08
27,3	1,8	2,390	0,286	0,682	0,379	0,002	60	ledviny61	1638	PP	45,52
33,8	1,79	2,390	0,354	0,846	0,472	0,003	60	ledviny62	2028	PP	61,12
18,4	1,78	2,300	0,200	0,461	0,258	0,000	45	ledviny7	828	SS	13,12
16,3	1,78	2,150	0,190	0,408	0,229	0,001	45	ledviny8	733,5	SS	9,34
25,2	1,79	2,180	0,289	0,629	0,351	0,001	45	ledviny9	1134	SS	25,36
34,4	1,76	2,320	0,372	0,860	0,488	0,010	60	ledviny50	2064	SS	62,56
27,1	1,73	2,350	0,289	0,677	0,392	0,010	60	ledviny53	1626	SS	45,04
25	1,66	2,390	0,262	0,625	0,376	0,010	120	ledviny55	3000	SS	100
35,3	1,79	2,390	0,368	0,882	0,492	0,004	60	ledviny63	2118	SS	64,72
33,9	1,72	2,390	0,354	0,847	0,493	0,008	120	ledviny30	4068	SP	142,72
28,3	1,74	2,330	0,304	0,707	0,407	0,010	60	ledviny48	1698	SP	47,92
17,2	1,69	1,780	0,242	0,429	0,254	0,011	60	ledviny49	1032	SP	21,28
28,2	1,73	2,240	0,315	0,706	0,409	0,011	60	ledviny51	1692	SP	47,68
17,3	1,71	1,640	0,264	0,432	0,253	0,006	60	ledviny54	1038	SP	21,52
23,4	1,65	2,360	0,248	0,586	0,354	0,007	120	ledviny56	2808	SP	92,32
25,9	1,77	2,350	0,275	0,648	0,367	0,011	60	ledviny66	1554	SP	42,16
7,3	1,81	0,320	0,580	0,184	0,101	0,012	10	nadledviny1	73	PP	7,55
15	1,88	1,570	0,239	0,374	0,199	0,006	5	nadledviny2	75	PP	8,30
11,7	1,84	0,630	0,462	0,293	0,159	0,013	5	nadledviny3	58,5	PP	2,08
20,9	1,85	1,250	0,419	0,523	0,283	0,025	5	nadledviny4	104,5	PP	19,43
21,1	1,88	1,510	0,349	0,527	0,281	0,011	5	nadledviny5	105,5	PP	19,81
7,4	1,75	1,680	0,111	0,186	0,106	0,010	10	nadledviny61	74	PP	7,92
6,7	1,73	1,330	0,126	0,168	0,097	0,012	10	nadledviny62	67	PP	5,28
8,9	1,64	0,910	0,245	0,222	0,135	0,016	6	nadledviny7	53,4	SS	0,15
10	1,79	1,850	0,135	0,249	0,139	0,013	6	nadledviny8	60	SS	2,64
10,1	1,8	1,510	0,168	0,254	0,141	0,012	6	nadledviny9	60,6	SS	2,87
14,5	1,85	0,430	0,854	0,363	0,196	0,013	10	nadledviny50	145	SS	34,72
11,2	1,83	0,340	0,833	0,281	0,154	0,005	10	nadledviny53	112	SS	22,26
9	1,79	1,740	0,129	0,224	0,125	0,013	10	nadledviny55	90	SS	13,96
7,1	1,65	1,610	0,110	0,176	0,107	0,022	10	nadledviny63	71	SS	6,79
11,3	1,73	1,720	0,164	0,282	0,163	0,035	10	nadledviny30	113	SP	22,64
11,1	1,82	0,470	0,587	0,278	0,153	0,011	10	nadledviny48	111	SP	21,89
15,1	1,88	0,850	0,441	0,376	0,200	0,009	10	nadledviny49	151	SP	36,98
6,5	1,81	0,430	0,374	0,163	0,090	0,005	10	nadledviny51	65	SP	4,53
13,7	1,83	2,040	0,168	0,342	0,186	0,011	10	nadledviny54	137	SP	31,70
11,9	1,83	1,820	0,163	0,297	0,163	0,011	10	nadledviny56	119	SP	24,91
7,3	1,78	1,610	0,113	0,181	0,102	0,006	10	nadledviny66	73	SP	7,55

koncentra ledviny 500 ng/ul
 koncentrace nadledviny 53 ng/ul

1 DEN – transkripce

µg/mL RNA	260/280	260/230	A230	A260	A280	A320	dilution	RNA ng/ul	kmen	přídavek vody na 20ul RNA	
26,3	1,85	2,040	0,321	0,657	0,356	0,015	10	sval1	263	PP	23,83
15,4	1,83	0,990	0,388	0,385	0,211	0,009	10	sval2	154	PP	5,67
22,2	1,87	1,700	0,325	0,554	0,297	0,012	10	sval3	222	PP	17,00
20,7	1,89	0,620	0,840	0,517	0,273	0,008	10	sval4	207	PP	14,50
19,8	1,82	1,610	0,307	0,494	0,271	0,014	10	sval5	198	PP	13,00
8,3	1,77	1,760	0,118	0,209	0,118	0,009	15	sval61	124,5	PP	0,75
9,1	1,76	1,750	0,130	0,228	0,129	0,009	15	sval62	136,5	PP	2,75
25,6	1,89	1,750	0,365	0,639	0,339	0,008	12	sval7	307,2	SS	31,20
26,3	1,87	1,760	0,373	0,658	0,351	0,008	12	sval8	315,6	SS	32,60
17,7	1,89	1,380	0,321	0,442	0,233	0,002	12	sval9	212,4	SS	15,40
29,3	1,86	1,380	0,531	0,732	0,394	0,017	10	sval50	293	SS	28,83
35,6	1,87	2,070	0,431	0,890	0,476	0,017	10	sval53	356	SS	39,33
33,2	1,85	1,930	0,429	0,830	0,449	0,016	10	sval55	332	SS	35,33
11,5	1,83	1,850	0,155	0,288	0,157	0,009	15	sval63	172,5	SS	8,75
21,4	1,87	1,750	0,307	0,536	0,287	0,012	10	sval30	214	SP	15,67
20,5	1,82	1,920	0,267	0,513	0,282	0,018	10	sval48	205	SP	14,17
6,4	1,71	1,630	0,098	0,159	0,093	0,010	10	sval49	64	SP	
35,1	1,84	2,020	0,435	0,879	0,477	0,023	10	sval51	351	SP	38,50
17,9	1,83	1,790	0,251	0,448	0,245	0,014	10	sval54	179	SP	9,83
23,7	1,84	2,030	0,291	0,593	0,321	0,016	10	sval56	237	SP	19,50
13,7	1,78	2,060	0,167	0,344	0,193	0,011	15	sval66	205,5	SP	14,25
33,6	1,81	2,340	0,359	0,840	0,464	0,008	24	tuk1	806,4	PP	21,35
15,6	1,83	0,870	0,447	0,390	0,214	0,006	25	tuk2	390	PP	0,00
28,6	1,8	1,970	0,362	0,715	0,398	0,007	25	tuk3	715	PP	16,67
20,7	1,82	2,210	0,234	0,517	0,284	0,005	25	tuk4	517,5	PP	6,54
27,2	1,84	1,680	0,406	0,681	0,370	0,010	25	tuk5	680	PP	14,87
25,5	1,82	1,910	0,334	0,637	0,351	0,007	30	tuk61	765	PP	19,23
25,5	1,83	2,220	0,288	0,638	0,350	0,008	30	tuk62	765	PP	19,23
15,2	1,79	1,720	0,221	0,381	0,212	0,009	30	tuk7	456	SS	3,38
16,2	1,83	2,170	0,186	0,405	0,221	0,001	30	tuk8	486	SS	4,92
13,6	1,87	2,100	0,162	0,341	0,183	0,000	30	tuk9	408	SS	0,92
36,4	1,81	2,380	0,384	0,911	0,503	0,012	30	tuk50	1092	SS	36,00
33,6	1,85	2,230	0,378	0,841	0,456	0,007	30	tuk53	1008	SS	31,69
21,6	1,75	2,400	0,225	0,539	0,308	0,006	60	tuk55	1296	SS	46,46
33,1	1,85	2,330	0,355	0,828	0,447	0,006	30	tuk63	993	SS	30,92
28,1	1,76	2,410	0,292	0,702	0,399	0,008	60	tuk30	1686	SP	66,46
25,3	1,79	2,130	0,297	0,633	0,353	0,014	30	tuk48	759	SP	18,92
31	1,81	2,310	0,336	0,776	0,430	0,013	30	tuk49	930	SP	27,69
31,6	1,82	2,250	0,351	0,790	0,434	0,013	30	tuk51	948	SP	28,62
35,9	1,86	2,320	0,387	0,898	0,483	0,008	30	tuk54	1077	SP	35,23
53,7	1,86	2,360	0,569	1,343	0,721	0,009	30	tuk56	1611	SP	62,62
28,7	1,78	2,290	0,314	0,719	0,405	0,008	30	tuk66	861	SP	24,15

koncentrace sval 120 ng/ul

koncentrace tuk 390 ng/ul

Příloha č.3 - Tabulka transkripce 4.den:

4.DEN – transkripce											přídavek vody
µg/mL RNA	260/280	260/230	A230	A260	A280	A320	dilution		RNA ng/ul	kmen	Na 20 ul RNA
13,4	1,55	2,240	0,149	0,334	0,216	0,001	200	játra12	2680	PP	87,2
13,2	1,55	2,380	0,139	0,331	0,213	0,001	200	játra15	2640	PP	85,6
19,9	1,59	2,390	0,208	0,496	0,313	0,002	200	játra16	3980	PP	139,2
19,6	1,59	2,390	0,205	0,491	0,309	0,003	200	játra17	3920	PP	136,8
18,7	1,59	2,350	0,199	0,469	0,295	0,001	200	játra18	3740	PP	129,6
14,8	1,57	2,410	0,154	0,371	0,237	0,000	200	játra19	2960	PP	98,4
29,3	1,59	2,420	0,303	0,732	0,460	0,021	202	játra47	5918,6	PP	216,744
32,8	1,61	2,400	0,342	0,821	0,509	0,020	203	játra70	6658,4	SS	246,336
37,2	1,64	2,400	0,388	0,931	0,567	0,021	206	játra87	7663,2	SS	286,528
30,5	1,6	2,390	0,320	0,764	0,476	0,022	207	játra90	6313,5	SS	232,54
37,3	1,62	2,420	0,385	0,933	0,578	0,022	208	játra93	7758,4	SS	290,336
35,6	1,62	2,410	0,370	0,891	0,549	0,022	209	játra112	7440,4	SS	277,616
32	1,61	2,390	0,335	0,801	0,496	0,024	210	játra113	6720	SS	248,8
34,7	1,61	2,410	0,360	0,867	0,538	0,023	211	játra114	7321,7	SS	272,868
16,7	1,55	2,350	0,178	0,418	0,270	0,010	200	játra10	3340	SP	113,6
16,5	1,57	2,130	0,193	0,412	0,263	0,003	200	játra11	3300	SP	112
14,8	1,55	2,170	0,170	0,369	0,237	0,002	200	játra13	2960	SP	98,4
14,9	1,56	2,410	0,154	0,372	0,239	0,002	200	játra14	2980	SP	99,2
39	1,6	2,440	0,401	0,976	0,608	0,023	200	játra44	7800	SP	292
20,8	1,55	2,380	0,219	0,521	0,337	0,021	204	játra73	4243,2	SP	149,728
26,8	1,57	2,410	0,278	0,669	0,426	0,022	205	játra85	5494	SP	199,76
29	1,69	2,290	0,317	0,725	0,428	0,014	40	srdce12	1160	PP	26,4
19,2	1,76	2,140	0,224	0,480	0,273	0,003	40	srdce15	768	PP	10,72
21,6	1,76	1,910	0,283	0,541	0,307	0,002	40	srdce16	864	PP	14,56
20,9	1,75	2,270	0,231	0,523	0,299	0,004	40	srdce17	836	PP	13,44
17,8	1,73	2,210	0,201	0,445	0,257	0,002	40	srdce18	712	PP	8,48
20,4	1,73	1,680	0,304	0,511	0,296	0,002	40	srdce19	816	PP	12,64
43,5	1,69	2,480	0,438	1,087	0,642	0,003	40	srdce47	1740	PP	49,6
18	1,66	2,340	0,192	0,450	0,270	0,001	40	srdce70	720	SS	8,8
36,1	1,73	2,380	0,379	0,903	0,523	0,007	40	srce87	1444	SS	37,76
13,1	1,64	2,030	0,161	0,327	0,200	0,011	40	srdce90	524	SS	0,96
22,2	1,47	1,910	0,291	0,554	0,377	0,107	40	srdce93	888	SS	15,52
32,3	1,63	2,480	0,326	0,808	0,497	0,014	60	srdce112	1938	SS	57,52
37,8	1,68	2,260	0,418	0,945	0,563	0,016	40	srdce113	1512	SS	40,48
21,6	1,57	2,340	0,230	0,539	0,343	0,038	80	srcdce114	1728	SS	49,12
35,9	1,83	2,360	0,380	0,897	0,491	0,000	20	srdce10	718	SP	8,72
25,8	1,69	2,440	0,264	0,646	0,381	0,002	40	srdce11	1032	SP	21,28
37,6	1,68	2,320	0,405	0,940	0,559	0,017	40	srdce13	1504	SP	40,16
22,8	1,66	2,350	0,242	0,569	0,343	0,003	40	srdce14	912	SP	16,48
28,4	1,67	2,440	0,291	0,709	0,425	0,000	40	srdce44	1136	SP	25,44
24,9	1,67	2,250	0,277	0,624	0,373	0,004	40	srdce73	996	SP	19,84
13	1,62	2,170	0,149	0,324	0,199	0,004	40	srdce85	520	SP	0,8

koncentrace srdce 500 ng/ul
koncentrace játra 500 ng/ul

4.DEN – transkripce											přídavek vody	
µg/mL RNA	260/280	260/230	A230	A260	A280	A320	dilution		RNA ng/ul	kmen	Na 20 ul RNA	
23,7	1,61	2,310	0,256	0,592	0,367	0,002	120	ledviny12	2844	PP	93,76	
25,9	1,7	2,090	0,310	0,647	0,380	0,004	60	ledviny15	1554	PP	42,16	
28,1	1,72	2,290	0,307	0,702	0,409	0,004	60	ledviny16	1686	PP	47,44	
32,5	1,72	2,330	0,349	0,813	0,472	0,005	60	ledviny17	1950	PP	58,00	
32,3	1,73	2,360	0,342	0,808	0,467	0,004	60	ledviny18	1938	PP	57,52	
25,5	1,71	2,350	0,271	0,637	0,373	0,003	60	ledviny19	1530	PP	41,20	
35,5	1,63	2,390	0,371	0,887	0,543	0,020	150	ledviny47	5325	PP	193,00	
24,5	1,67	2,250	0,272	0,612	0,367	0,019	90	ledviny70	2205	SS	68,20	
32	1,64	2,360	0,340	0,801	0,489	0,021	120	ledviny87	3840	SS	133,60	
29,3	1,67	2,180	0,336	0,732	0,437	0,020	90	ledviny90	2637	SS	85,48	
23	1,71	2,180	0,263	0,574	0,336	0,018	90	ledviny93	2070	SS	62,80	
34,6	1,63	2,380	0,364	0,866	0,531	0,022	180	ledviny112	6228	SS	229,12	
30,8	1,65	2,340	0,330	0,771	0,466	0,019	150	ledviny113	4620	SS	164,80	
33,2	1,64	2,350	0,353	0,830	0,506	0,021	120	ledviny114	3984	SS	139,36	
19,1	1,69	2,300	0,207	0,478	0,283	0,006	60	ledviny10	1146	SP	25,84	
20	1,59	2,310	0,216	0,499	0,313	0,003	120	ledviny11	2400	SP	76,00	
18,6	1,58	2,370	0,196	0,464	0,294	0,003	120	ledviny13	2232	SP	69,28	
26,3	1,71	2,260	0,291	0,658	0,384	0,004	60	ledviny14	1578	SP	43,12	
38,2	1,38	1,510	0,631	0,955	0,692	0,347	150	ledviny44	5730	SP	209,20	
24,3	1,66	2,300	0,264	0,608	0,367	0,020	90	ledviny73	2187	SP	67,48	
32	1,64	2,360	0,340	0,801	0,489	0,021	120	ledviny85	3840	SP	133,60	
											0,00	
22,4	1,78	2,060	0,273	0,561	0,315	0,016	10	nadledviny12	224	PP	29,78	
5,4	1,66	0,650	0,208	0,136	0,082	0,015	10	nadledviny15	54	PP	-8,00	
9,5	1,76	0,330	0,709	0,237	0,135	0,012	10	nadledviny16	95	PP	1,11	
9,5	1,75	0,270	0,878	0,237	0,135	0,012	10	nadledviny17	95	PP	1,11	
11,3	1,75	1,320	0,214	0,283	0,162	0,014	10	nadledviny18	113	PP	5,11	
10,4	1,74	1,080	0,240	0,260	0,149	0,012	10	nadledviny19	104	PP	3,11	
14,2	1,82	1,980	0,180	0,356	0,195	0,013	10	nadledviny47	142	PP	11,56	
15,1	1,26	1,120	0,336	0,377	0,298	0,208	10	nadledviny70	151	SS	13,56	
9,5	1,76	1,840	0,129	0,237	0,135	0,013	10	nadledviny87	95	SS	1,11	
3,3	1,61	1,460	0,057	0,083	0,051	0,009	10	nadledviny90	33	SS	-12,67	
7,2	1,7	0,220	0,818	0,181	0,106	0,013	10	nadledviny93	72	SS	-4,00	
10,4	1,77	0,660	0,394	0,261	0,148	0,016	10	nadledviny112	104	SS	3,11	
9,1	1,73	1,630	0,139	0,227	0,131	0,018	10	nadledviny113	91	SS	0,22	
12	1,78	1,460	0,206	0,300	0,168	0,015	10	nadledviny114	120	SS	6,67	
31,8	1,2	1,150	0,694	0,795	0,663	0,512	10	nadledviny10	318	SP	50,67	
12,3	1,76	1,620	0,191	0,308	0,175	0,015	10	nadledviny11	123	SP	7,33	
18,1	1,81	1,170	0,389	0,453	0,250	0,015	10	nadledviny13	181	SP	20,22	
10,1	1,74	1,610	0,156	0,252	0,145	0,016	10	nadledviny14	101	SP	2,44	
15,1	1,81	1,980	0,191	0,377	0,208	0,012	10	nadledviny44	151	SP	13,56	
9,1	1,76	1,760	0,130	0,229	0,130	0,013	10	nadledviny73	91	SP	0,22	
9,4	1,75	1,840	0,127	0,234	0,133	0,015	10	nadledviny85	94	SP	0,89	

koncentra ledviny 500 ng/ul
koncentrace nadledviny 90 ng/ul

4.DEN – transkripce											přídavek vody
µg/mL RNA	260/280	260/230	A230	A260	A280	A320	dilution		RNA ng/ul	kmen	Na 20 ul RNA
15,5	1,8	0,800	0,480	0,386	0,215	0,007	10	tuk12	155	PP	0,67
21,1	1,76	1,720	0,307	0,527	0,300	0,010	10	tuk15	211	PP	8,13
26,4	1,81	1,720	0,382	0,659	0,365	0,011	10	tuk16	264	PP	15,20
30,9	1,81	2,080	0,372	0,773	0,427	0,009	10	tuk17	309	PP	21,20
26,5	1,82	2,150	0,308	0,662	0,364	0,008	10	tuk18	265	PP	15,33
23,5	1,77	1,970	0,298	0,586	0,331	0,009	10	tuk19	235	PP	11,33
5,6	1,6	2,050	0,069	0,141	0,088	0,009	90	tuk47	504	PP	47,20
22	1,76	2,020	0,273	0,551	0,314	0,013	30	tuk70	660	SS	68,00
22,3	1,72	2,210	0,252	0,558	0,324	0,012	30	tuk87	669	SS	69,20
15,8	1,67	2,110	0,187	0,396	0,237	0,014	30	tuk90	474	SS	43,20
11,7	1,68	1,780	0,165	0,293	0,174	0,014	30	tuk93	351	SS	26,80
31,7	1,68	2,410	0,329	0,792	0,471	0,013	40	tuk112	1268	SS	149,07
31,9	1,76	2,320	0,344	0,798	0,453	0,014	30	tuk113	957	SS	107,60
35,7	1,31	1,260	0,706	0,891	0,681	0,432	30	tuk114	1071	SS	122,80
25,6	1,79	1,860	0,344	0,639	0,357	0,009	10	tuk10	256	SP	14,13
26,2	1,81	1,400	0,469	0,656	0,362	0,010	10	tuk11	262	SP	14,93
35,1	1,55	1,650	0,531	0,877	0,565	0,215	10	tuk13	351	SP	26,80
27,2	1,82	1,250	0,543	0,681	0,375	0,009	10	tuk14	272	SP	16,27
24	1,67	2,380	0,252	0,600	0,359	0,010	40	tuk44	960	SP	108,00
20,1	1,65	2,150	0,234	0,503	0,305	0,013	40	tuk73	804	SP	87,20
19,9	1,72	2,260	0,220	0,498	0,290	0,013	30	tuk85	597	SP	59,60
36,2	1,85	1,970	0,460	0,904	0,489	0,013	10	sval12	362	PP	52,40
43,4	1,9	1,030	1,056	1,086	0,571	0,013	10	sval15	434	PP	66,80
22,2	1,79	1,020	0,544	0,554	0,310	0,010	20	sval15	444	PP	68,80
37,4	1,86	1,550	0,604	0,934	0,503	0,014	10	sval16	374	PP	54,80
38,8	1,86	1,810	0,537	0,970	0,520	0,015	10	sval17	388	PP	57,60
29,3	1,83	1,730	0,424	0,731	0,399	0,016	10	sval18	293	PP	38,60
25,7	1,83	1,540	0,418	0,643	0,352	0,017	10	sval19	257	PP	31,40
19,6	1,83	1,740	0,282	0,490	0,268	0,013	15	sval47	294	PP	38,80
10,6	1,73	0,920	0,287	0,265	0,153	0,013	15	sval70	159	SS	11,80
6,7	1,59	1,100	0,153	0,169	0,106	0,013	15	sval87	100,5	SS	0,10
6,7	1,65	1,420	0,118	0,166	0,101	0,014	15	sval90	100,5	SS	0,10
12,5	1,76	1,160	0,270	0,313	0,178	0,013	15	sval93	187,5	SS	17,50
16,6	1,78	2,040	0,203	0,415	0,233	0,013	15	sval112	249	SS	29,80
23,2	1,75	2,130	0,272	0,579	0,330	0,013	20	sval113	464	SS	72,80
28,5	1,69	2,070	0,345	0,714	0,423	0,082	15	sval114	427,5	SS	65,50
19,1	1,81	1,510	0,316	0,478	0,265	0,015	10	sval10	191	SP	18,20
37,8	1,88	1,780	0,532	0,945	0,502	0,011	10	sval11	378	SP	55,60
22,5	1,85	0,900	0,629	0,564	0,305	0,011	10	sval13	225	SP	25,00
20,4	1,84	0,540	0,952	0,511	0,277	0,010	10	sval14	204	SP	20,80
24	1,67	2,380	0,252	0,600	0,359	0,010	40	tuk44	960	SP	172,00
20,5	1,75	1,670	0,307	0,514	0,294	0,013	15	sval73	307,5	SP	41,50
8,4	1,68	1,740	0,121	0,210	0,125	0,015	15	sval85	126	SP	5,20

koncentrace tuk 150 ng/ul
 koncentrace sval 100 ng/ul