MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno 2015 **Martin Hořák**

MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Oddělení genetiky a molekulární biologie

VLIV GENETICKÉ VARIABILITY V GENU PRO FSTL1 NA TĚLESNÉ SLOŽENÍ U ATLETŮ V TRÉNINKU I U BĚŽNÉ OBÉZNÍ I NEOBÉZNÍ ČESKÉ POPULACE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MARTIN HOŘÁK

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. MUDr. Julie Bienertová-Vašků, Ph.D.

Brno 2015

Bibliografický záznam

Autor: Bc. Martin Hořák
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Vliv genetické variability v genu pro FSTL1 na tělesné složení u atletů v tréninku i u běžné obézní i neobézní české populace

Studijní program: Experimentální biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika

Vedoucí práce: doc. MUDr. Julie Bienertová-Vašků, Ph.D.

Akademický rok: 2014/2015

Počet stran: 63

Klíčová slova: FSTL1, rs1057231, kosterní sval, výška, fyzická aktivita, hormony

Bibliographic Entry

Author: Bc. Martin Hořák
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: The influence of genetic variation in the FSTL1 gene on body composition in training athletes and general obese and non-obese Czech population

Degree Programme: Experimental biology

Field of Study: Molecular biology and genetics

Supervisor: doc. MUDr. Julie Bienertová-Vašků, Ph.D.

Academic Year: 2014/2015

Number of Pages: 63

Keywords: FSTL1, rs1057231, skeletal muscle, height, physical activity, hormones

Abstrakt

Je známo, že fyzická aktivita má vliv na množství akutních i chronických změn v kosterním svalu, ačkoliv molekulární procesy, které jsou za tyto změny zodpovědné, nejsou plně definovány. U genu *FSTL1* je na základě jeho homologie s folistatinem a několika popsaných asociací předpokládána funkce ve fyziologii kosterního svalu, přestože mechanismy jeho účinku nejsou v současné době zcela pochopeny.

mikroRNA (miRNA) jsou negativní regulátory genové exprese, které fungují na post-transkripční úrovni na bázi vzájemné komplementarity mezi miRNA a mRNA. Výskyt jednonukleotidového polymorfismu ve vazebném místě pro miRNA v 3‘ nepřekládané oblasti (UTR) genu může vést ke ztrátě současného nebo ke vzniku nového nelegitimního vazebného místa pro miRNA, což může ovlivnit jejich vzájemnou komplementaritu a vést ke změně hladiny mRNA a proteinu.

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat právě takový SNP (rs1057231) v 3‘ UTR genu *FSTL1*. U alely G tohoto SNP bylo předpovězeno, že způsobuje ztrátu vazebného místa pro některé miRNA, což by mělo výsledně navýšit hladinu proteinu FSTL1. Bylo testováno, zda tento SNP má vliv na změnu množství hmoty kosterního svalu a/nebo dalších charakteristik fyzické aktivity antropometrických znaků. Byly studovány 2 kohorty jedinců, kohorta obézních a neobézních (OB) o 183 subjektech a kohorta výkonnostních atletů v různém typu tréninku (SPO) o 31 subjektech.

Navzdory původní hypotéze nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny u hmoty kosterního svalu s ohledem na genotyp *FSTL1*. Nicméně byla pozorována asociace u nosičů alely G s vyšším vzrůstem u mužů ($p = 0,031$) a opačná, ale statisticky nevýznamná, asociace genotypu TT s vyšším vzrůstem u žen ($p = 0,2$), společně s asociací alely G s vyšším celkovým denním počtem kroků. Na druhou stranu nebyla pozorována žádná změna v souvislosti s genotypem u kohorty SPO.

Závěrem, byla zjištěna asociace SNP rs1057231 s výškou a fyzickou aktivitou u jedinců z kohorty OB. Ačkoliv je funkce FSTL1 v organismu málo známá, předpokládám, že se FSTL1 může nově účastnit regulace pohlavních hormonů, jelikož byly pozorovány opačné asociace mezi muži a ženami.

Abstract

It is well known that physical activity raises a number of acute and chronic changes in skeletal muscle, however, molecular processed responsible for such changes are not well defined. The *FSTL1* gene has an assumed function in skeletal muscle based on its homology with follistatin and several described associations with skeletal muscle, athough mechanisms of its action are not currently fully understood.

microRNAs (miRNAs) negatively regulate gene expression at post-transcriptional level via miRNA–mRNA interactions based on their mutual complementarity. The occurrence of single nucleotide polymorphism in the miRNA binding site within the 3‘ untranslated region (UTR) of the targeted gene may leads to the loss of current and/or gain of a new illegitimate miRNA binding site, which may affect their mutual complementarity and subsequently result in changes to both mRNA and protein levels.

This study investigated such SNP (rs1057231) in the 3‘ UTR of the *FSTL1* gene. The G allele of this SNP was predicted to cause loss of a binding site for several miRNAs, which should enhance FSTL1 protein level. We tested whether this SNP results in a change of skeletal muscle mass and/or other anthropometric and physical activity characteristics. Two different cohorts were tested in this study, a cohort of obese and non-obese (OB) with 183 subjects and a cohort of athletes in different type of training (SPO) with 31 subjects.

Despite my original hypothesis, I did not observe any differences in skeletal muscle mass with respect to the *FSTL1* genotype. Nevertheless, we observed an association of G allele carriers with higher height among males ($p = 0.031$) and an opposite but statistically insignificant association of the TT genotype with higher height among females ($p = 0.2$) together with the association of the G allele with higher total daily number of steps. On the other hand, no association was observed in the context of the genotype in the SPO cohort.

In summary, the association of SNP rs1057231 with height and the total daily number of steps of an individual in the Central European population was reported. Furthermore, although FSTL1 function is still not well defined, I presume that FSTL1 may be involved in sex-dependent hormone regulations, as distinct associations were observed in males and females.

Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: **Bc. Martin Hořák**

Studijní program: **Experimentální biologie**
Studijní obor: **Molekulární biologie a genetika**
Studijní směr: Molekulární biologie a genetika

Ředitel Ústavu experimentální biologie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s tématem:

Vliv genetické variability v genu pro FSTL1 na tělesné složení u atletů v tréninku i u běžné obézní i neobézní české populace

The influence of genetic variation in the FSTL1 gene on body composition in training athletes and general obese and non-obese Czech population

Oficiální zadání:
Cílem DP je prozkoumání genetické variability v genu pro FSTL1 v kontextu vývoje adaptační odpovědi kosterního svalu u skupiny atletů a srovnávací obézní a neobézní české populace a vliv vybraných microRNA na adaptaci svalu u vytrvalostních atletů.

Literatura:
Regulation of follistatin-like protein 1 expression and secretion in primary human skeletal muscle cells. Görgens et al., 2013

Jazyk závěrečné práce: český
Vedoucí diplomové práce: doc. MUDr. Julie Bienertová Vašků, Ph.D.
Podpis vedoucího práce:
Konzultant:
Datum zadání diplomové práce: listopad 2013

V Brně dne 4.5.2015

prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel Ústavu experimentální biologie

Zadání diplomové práce převzal dne 4.5.2015:

Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména své školitelce doc. MUDr. Julii Bienertové-Vašků, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a motivaci při vypracovávání mé diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Bc. Filipu Zlámalovi za pomoc se statistickým zpracováním dat a Mgr. Zbyňku Šplíchalovi a MUDr. Janu Novákovi za teoretické i praktické rady. Poděkování taktéž patří všem pracovníkům Ústavu patologické fyziologie za zaučení do laboratorních metod a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 9.5. 2015

.....

Martin Hořák

OBSAH

1 ÚVOD 13

1.1 Funkce a vývoj kosterního svalu 13

1.2 Gen pro FSTL1 15

1.2.1 Objev a struktura genu pro FSTL1 15

1.2.2 Funkce genu pro FSTL1 v kosterním svalu 16

1.3 mikroRNA 17

1.3.1 Co jsou mikroRNA? 17

1.3.2 Objev a historie miRNA 18

1.3.3 Biogeneze a funkce miRNA 19

1.3.4 Svalově-specifické miRNA 22

1.4 Vliv genetické variability na vazbu mikroRNA 23

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE 24

3 MATERIÁL A METODY 25

3.1 Subjekty studie 25

3.1.1 Kohorta obézních a neobézních jedinců (OB) 25

3.1.2 Kohorta výkonnostních sportovců v různém typu tréninku (SPO) 25

3.2 Kandidátní geny a genetické varianty 26

3.3 Izolace DNA 28

3.3.1 Izolace DNA ze slin 28

3.3.2 Izolace DNA z periferní krve 28

3.4 Návrh primerů a restrikčního enzymu 29

3.5 PCR 30

3.6 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů 32

3.7 Agarózová elektroforéza 33

3.8 Statistická analýza 33

4 VÝSLEDKY 35

4.1 Restrikční analýza a genotypizace 35

4.2 Základní charakteristika studovaných jedinců 35

4.3 Žádná asociace FSTL1 s hmotou kosterního svalu u kohorty OB 38

4.4 Asociace FSTL1 s výškou u kohorty OB 40

4.5 Asociace FSTL1 s fyzickou aktivitou u kohorty OB 41

4.6 Žádná asociace FSTL1 se studovanými znaky u kohorty SPO 41

5 DISKUSE 43

5.1 Žádná asociace FSTL1 s hmotou kosterního svalu u kohorty OB 44
5.2 Rozdílná asociace FSTL1 s výškou mezi muži a ženami u kohorty OB 46
5.3 Asociace alely G s vyšší fyzickou aktivitou u kohorty OB 48
5.4 Žádná asociace FSTL1 se studovanými znaky u kohorty SPO 50
5.5 Limitace diplomové práce 51
6 SHRNUTÍ 53
7 SUMMARY 54
8 PŘEHLED LITERATURY 55

Seznam zkratek

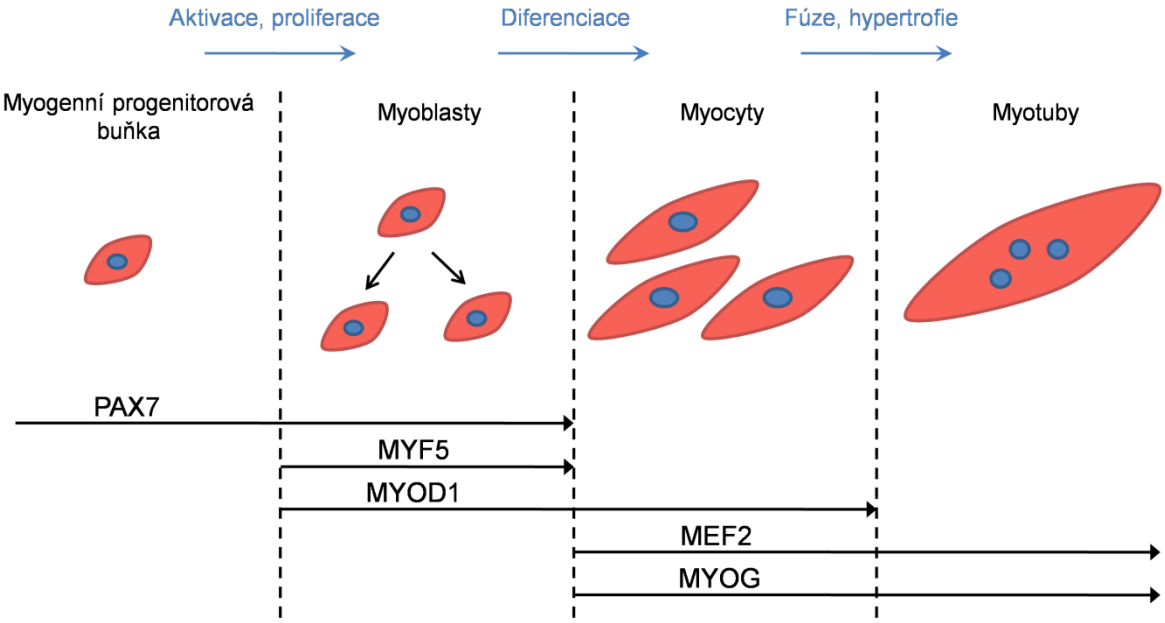
AGO2	argonaute RISC catalytic component 2
AKT	proteinkináza B
bHLH	basic helix-loop-helix
BMP	bone morphogenetic proteins
cal.AM	aritmetický průměr energetického výdeje
cal.GM	geometrický průměr energetického výdeje
DGCR8	DGCR8 microprocessor complex subunit
DIP2A	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A
dNTP	deoxyribonukleotidy
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
FS doména	folistatinová doména
FST	follistatin
FSTL1	follistatin-like 1
m^7G	7-methylguanosin
MEF2	myocyte enhancer factor 2
miRNA	mikroRNA
MLK1	megakaryoblastic leukemia (translocation) 1
MM	Master-mix
MRE	mikroRNA response element
MRF	myogenic regulatory factors (myogenní regulační faktory)
MSTN	myostatin
MYF5	myogenic factor 5
MYF6	myogenic factor 6 (herculin)
MYOD1	myogenic differentiation 1
MYOG	myogenin

NCBI	National Center for Biotechnology Information
ncRNA	non-coding RNA (nekódující RNA)
OB	kohorta obézních a neobézních jedinců
PAX3	paired box 3
PAX7	paired box 7
pre-miRNA	prekurzorová mikroRNA
pri-miRNA	primární mikroRNA
PRKRA	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator
pTBSMM	percentage of total body skeletal muscle mass (procento celkového množství hmoty kosterního svalu)
RISC	RNA-induced silencing complex
SDS	dodecylsíran sodný
SMAD	small mothers against decapentaplegic
SM	skeletal muscle (kosterní sval)
SMM	skeletal muscle mass (hmota kosterního svalu)
SNP	single nucleotide polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)
SPARC	secreted protein acidic and rich in cysteine
SPO	kohorta výkonnostních sportovců v různém typu tréninku
SRF	serum response factor
TARBP2	TAR (HIV-1) RNA binding protein 2
TE pufr	Tris/EDTA pufr
TGFB	transforming growth factor, beta
TNRC	trinucleotide repeat containing
Tris	tris(hydroxymethyl)aminometan
TSC-36	TGFB-stimulated clone 36
UTR	untranslated region (nepřekládaná oblast)
XPO5	exportin 5

1 ÚVOD

1.1 Funkce a vývoj kosterního svalu

Celková svalová hmota je u lidí tvořena několika typy svalových tkání. Konkrétně se jedná o hladkou svalovinu, zahrnující autonomně řízené svaly cév a vnitřností, a příčně pruhovanou svalovinu, která se dále dělí na srdeční, branchiální a kosterní svalstvo (skeletal muscle; SM). Srdeční, branchiální a kosterní svalstvo se nazývá pruhované z důvodu jejich pruhovaného vzhledu, který je dán střídáním Aktinu a Myozinu tvořících sarkomeru. Ty se dále nachází uvnitř myofibril, jejichž shluk dává vznik svalovému vláknu. Vývoj SM zajišťují buňky pocházející ze somitů odvozených z mezodermu; tento vývoj, neboli myogeneze, je velmi komplikovaný proces tvořený několika hlavními fázemi: (1) dochází k aktivaci a proliferaci myogenních progenitorových buněk, z nichž následně vznikají jednojaderné vřetenovité buňky myoblasty, (2) myoblasty fungují jako prekurzory myocytů, které vznikají jejich diferenciací, a (3) myocyty následně terminálně diferencují a fúzují za vzniku mnohojaderných válcovitých myotubů, (4) myotuby fungují jako vývojové stádium svalových vláken, k jejichž vzniku dochází po nahromadění myofibril v myotubech, které vytlačují buněčná jádra k periferii (viz **Obrázek 1**) (Knight & Kothary, 2011). Vývoj SM je komplexní vývojový proces, který vyžaduje přesnou genovou regulaci pro správný růst, morfologii a funkci svalu, tj. geny zajišťující buněčnou proliferaci, diferenciaci, komunikaci, migraci a smrt. Tyto procesy jsou převážně řízeny myogenními regulačními faktory (myogenic regulatory factors; MRF) z rodiny bHLH (basic helix-loop-helix) transkripčních faktorů; konkrétně MYOD1 (myogenic differentiation 1), MYF5 (myogenic factor 5), MYOG (myogenin) a MYF6 (myogenic factor 6 (herculin)) společně s dalšími transkripčními faktory hrajícími úlohu v procesu myogeneze jako jsou PAX3 (paired box 3), PAX7 (paired box 7) a MEF2 (myocyte enhancer factor 2) (Massari & Murre, 2000; Perry & Rudnick, 2000; Brand-Saberi, 2005). V první fázi vývoje SM jsou přítomny progenitorové buňky exprimující PAX7, následně se uplatňují transkripční faktory MYOD1 a MYF5, které zajišťují proliferaci a diferenciaci myogenních progenitorových buněk na myoblasty, v diferenciaci myoblastů v myotuby hraje klíčovou úlohu MYOG a MEF2 a transkripční faktor MYF6 se účastní diferenciace a determinace buněčného osudu (viz **Obrázek 1**) (Knight & Kothary, 2011; Ito *et al.*, 2012).



Obrázek 1. Myogeneze a účast transkripčních faktorů v regulaci dílčích procesů. Horní část obrázku graficky znázorňuje procesy myogeneze. Dolní část obrázku zobrazuje myogenní transkripční faktory nezbytné pro proces myogeneze a jednotlivé fáze, pro které jsou vyžadovány (Knight & Kothary, 2011; upraveno).

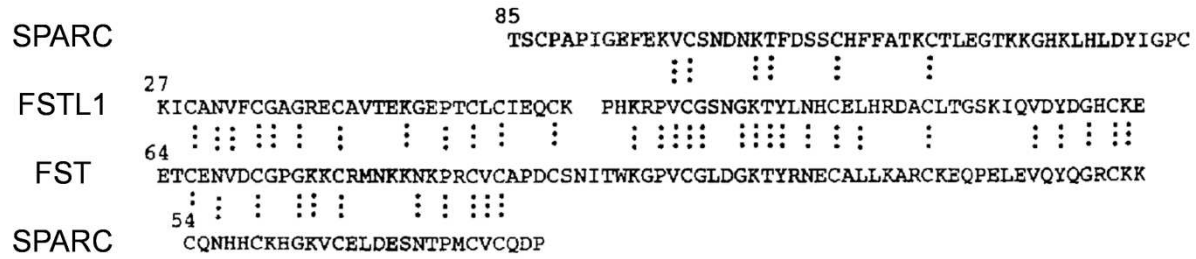
Hmota kosterního svalu (skeletal muscle mass; SMM) tvoří u dospělého jedince velkou většinu svalové hmoty těla, mezi pohlavími to je přibližně 42 % u mužů a 38 % u žen. Většina SM je upevněna na kostech pomocí šlach, což také souvisí s jejich funkcí. SM má schopnost kontrakce, která zajišťuje pohybové funkce těla. Kromě pohybu se SM také podílí na držení vzpřímeného postoje těla, ochraně vnitřních orgánů a tkání, produkci tepla a ukládání proteinových zásob. Správná svalová funkce je nezbytná pro aktivní životní styl a jakákoliv odchylka od normálního vývoje SM nebo jeho funkce může mít nepříznivý vliv na zdravotní stav jedince a vést k velkému množství poruch jako jsou například myopatie nebo dokonce ke zvýšené mortalitě. Vzhledem k těmto okolnostem je nezbytné plně pochopit úlohu genů, genetických variant, signálních kaskád a epigenetických faktorů, které mají přímý či nepřímý vliv na tyto procesy, jelikož by tyto znalosti mohly být následně využity v terapii. Zájem o tuto problematiku je dobře patrný z každoročního narůstajícího počtu publikací týkajících se patologie svalu (zdroj PubMed).

1.2 Gen pro FSTL1

Jak bylo zmíněno výše, vývoj a funkce SM zahrnují nespočet signálních kaskád a genových interakcí, které v dnešní době ještě zdaleka nejsou plně známy. V minulosti bylo již popsáno velké množství genů, u kterých byl zjištěn vliv na SM. Mezi tyto geny patří například myostatin (*MSTN*), dobře popsaný negativní regulátor svalové diferenciace a svalového růstu, nebo jeho antagonista folistatin (*FST*) (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998; Lee & McPherron, 2001). Naproti tomu je znám nespočet genů, které mají předpokládanou funkci v SM na základě popsaných asociací, bioinformatických předpovědí nebo jejich homologií s již popsanými geny. Mezi tyto geny patří také gen pro FSTL1 (Follistatin-like 1).

1.2.1 Objev a struktura genu pro FSTL1

Gen *FSTL1* byl objeven v roce 1993 ve studii, která byla navržena pro identifikaci genů zahnutých v regulaci TGFB (transforming growth factor, beta), a proto byl jeho původní název *TSC-36* (TGFB-stimulated clone 36) (Shibanuma *et al.*, 1993). Následně bylo popsáno, že *FSTL1* kóduje extracelulární glykoprotein exprimovaný a sekretovaný buňkami SM a že má určitou homologii s genem *FST* a nižší homologii s genem *SPARC* (secreted protein acidic and rich in cysteine), který taktéž kóduje protein sekretovaný buňkami SM a navíc se účastní vývoje a regenerace SM (viz **Obrázek 2**) (Shibanuma *et al.*, 1993; Ouchi *et al.*, 2008; Jørgensen *et al.*, 2009).



Obrázek 2. Porovnání aminokyselinových sekvencí mezi proteiny FSTL1, FST a SPARC. Aminokyselinová sekvence (27-102) proteinu FSTL1 je porovnána s homologními sekvencemi proteinů FST a SPARC. Toto přiložení znázorňuje konzervované cysteinové zbytky charakteristické pro FS doménu. Tečkované čáry znázorňují identické aminokyseliny (Shibanuma *et al.*, 1993; upraveno).

FSTL1 se nachází v lokusu 3q13.33 a obsahuje 11 exonů. Jak vyplývá ze samotného současného názvu a popsané homologie genu *FSTL1* s genem *FST*, *FSTL1* sdílí určité strukturní domény charakteristické pro proteiny folistatinové rodiny. Nejvýznamnější, a pro tuto proteinovou rodinu definující, je přítomnost Aktivin-vázající folistatinové domény, tzv. FS domény, obsahující deset cysteinových zbytků (Shibanuma *et al.*, 1993). Kromě FS domény je přítomná u *FSTL1* také kalcium-vázající doména, u které však bylo zjištěno, že je nefunkční (Hambrock *et al.*, 2004). Podle NCBI (National Center for Biotechnology Information) obsahuje gen *FSTL1* dále EFh doménu, Kazal-like doménu a VWFC doménu.

1.2.2 Funkce genu pro FSTL1 v kosterním svalu

Ačkoliv bylo zjištěno, že se *FSTL1* účastní velkého množství fyziologických funkcí zahrnujících buněčnou proliferaci, diferenciaci, migraci, pro-zánětlivé účinky, svalový růst a fibrózu, ale také tumor supresorovou funkci v případě potlačení nádorového růstu a invazivity, mechanismus účinku tohoto genu je stále velmi málo prozkoumaný (Miyamae *et al.*, 2006; El-Armouche *et al.*, 2011; Sundaram *et al.*, 2013; Görgens *et al.*, 2013). Konkrétní výzkumy týkající se *FSTL1* ve svalu potvrdily jeho zapojení ve funkci endoteliálních buněk, inhibici apoptózy a revaskularizaci SM (Ouchi *et al.*, 2008). Tyto procesy následně vedly k aktivaci AKT (proteinkináza B) signalizace a růstu svalových vláken. Serin/threonin protein kináza AKT hraje, mimo jiné, klíčovou roli v regulaci buněčného růstu a metabolismu, což může vést ke svalové hypertrofii (Shiojima & Walsh, 2006). Následně bylo zjištěno, že *FSTL1* se přímo podílí na fosforylaci AKT, ale také, že samotná exprese *FSTL1* je stimulována v případě aktivace této signální dráhy (Oshima *et al.*, 2008; Ouchi *et al.*, 2008, 2010). Další studie poskytla výsledky o přímém zapojení *FSTL1* v regulaci vývojového růstu svalových buněk a jejich diferenciaci v SM u dobytka (Lehnert *et al.*, 2007). V současné době není publikováno mnoho výzkumů týkajících se zapojení genu *FSTL1* v SM, naopak více studií bylo publikováno na jeho funkci v srdečním svalu. Konkrétně je možné zmínit práci popisující hladinu proteinu FSTL1 jako prediktoru pro hypertrofii levé srdeční komory (El-Armouche *et al.*, 2011).

Jak bylo předpovězeno na základě *in silico* analýzy FS domény genu *FSTL1* a následně potvrzeno experimentálně, FSTL1 hraje roli v regulaci proteinů TGFB superrodiny (Tanaka *et al.*, 2010). Mezi členy TGFB proteinové rodiny patří například výše zmíněný Aktivin, který je vázán a neutralizován FS doménou, ale například také BMP (bone morphogenetic proteins), které se účastní, mimo jiné, široké škály vývojových procesů

(Kingsley, 1994). Bylo objeveno, že protein FSTL1 antagonizuje účinky BMP a negativní regulace těchto růstových faktorů může mít následně vliv na široké spektrum signálních drah týkajících se především buněčné proliferace a diferenciace (Sylva *et al.*, 2011; Geng *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012). Některé studie naznačily úlohu BMP jako negativních regulátorů myogeneze, jelikož při aplikaci exogenních BMP došlo k přesměrování diferenciační dráhy myogenních buněk na dráhu buněk osteoblastové linie (Katagiri *et al.*, 1994; Aoki *et al.*, 2001; Nojima *et al.*, 2010). Nicméně, ve studii, kde byly zkoumány účinky endogenních BMP došli autoři k závěru, že přiměřené množství BMP je v procesu myogeneze nezbytné (Furutani *et al.*, 2011; Umemoto *et al.*, 2011). Konkrétně bylo popsáno, že aktivita BMP2 hraje klíčovou úlohu u nediferenciovaných proliferujících myoblastů v procesu jejich diferenciace v myotuby (Furutani *et al.*, 2011). Druhá studie vedla k závěrům, že v případě endogenního BMP4 dochází ke zvýšení jeho exprese v průběhu svalového vývoje a že exprese BMP2 je nezbytná v myoblastech, kde zajišťuje správnou formaci myotubů a jejich následnou diferenciaci díky stimulaci exprese MYOG (Umemoto *et al.*, 2011). Tyto výzkumy naznačují funkci BMP v mezenchymální buněčné diferenciaci. Navíc, MYOG je myogenní transkripční faktor, který, mimo jiné, má pozitivní dopad na expresi svalově-specifických mikroRNA, které potlačují expresi genu *FSTL1*; tato regulace pomocí mikroRNA a jejich funkce je podrobněji popsána v následující kapitole (Rao *et al.*, 2006).

FSTL1 je exprimován téměř ve všech tkáních člověka, jak během vývoje, tak v době dospělosti, s významnou expresí v mezenchymálních tkáních (Tsuchida *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2007, 2010). Z výše zmíněného je proto pro protein FSTL1 předpokládána funkce regulátoru nejrůznějších vývojových procesů zahrnujících regulaci somitogeneze, myogeneze a nervového vývoje. Nedostatečná znalost funkce *FSTL1* je tedy především výsledkem celkově malého množství publikací, které navíc často prezentují rozporuplné výsledky.

1.3 mikroRNA

1.3.1 Co jsou mikroRNA?

mikroRNA (miRNA nebo miR, s jednotlivými miRNA značenými miR-# a jednotlivými geny značenými *mir-#*) je třída evolučně konzervovaných represorů genové exprese, která se nachází u rostlin, zvířat i virů, a působí převážně na post-transkripční úrovni (Bartel, 2004). Jedná se o krátké nekódující RNA (ncRNA) s přibližnou délkou 22 nukleotidů, které jsou schopny potlačit expresi genů na základě interakce mezi miRNA a cílovou mRNA,

což může vést k degradaci této mRNA nebo k inhibici její translace. Tato interakce je založena na vzájemné komplementaritě sekvencí RNA, konkrétně mezi 5‘ koncem miRNA (nukleotidy 2-8, tzv. „seed“ sekvence) a 3‘ nepřekládanou oblastí (untranslated region; UTR) mRNA, ačkoliv bylo zjištěno, že některé miRNA se mohou v určitých případech vázat na 5‘ UTR nebo dokonce na kódující sekvenci (Jopling, 2005; Forman *et al.*, 2008; Ørom *et al.*, 2008). Také bylo zjištěno, že tyto ncRNA nemusí vždy působit na post-transkripční úrovni, ale mohou také přímo ovlivnit transkripci na základě vazby do promotorové oblasti cílových genů (Schwartz *et al.*, 2008). Účinky miRNA jsou velmi komplexní a není lehké zmapovat jejich regulační procesy, jelikož jediná miRNA může interagovat s velkým množstvím genů (desítky až stovky) a naopak jeden gen může být cílen velkým množstvím různých miRNA molekul. Jak je většinou uváděno, miRNA fungují jako negativní regulátory genové exprese, avšak některé výzkumy potvrzují, že tento účinek není univerzální, jelikož bylo prokázáno, že v určitých případech může miRNA fungovat jako aktivátor genové exprese (Vasudevan *et al.*, 2007; Ørom *et al.*, 2008). Budoucí výzkum molekul miRNA bude pravděpodobně velmi důležitý pro možné terapeutické využití, jelikož bylo predikováno, že miRNA regulují více než 60 % genů savčího genomu, ne-li všechny (Friedman *et al.*, 2009). Tyto současné znalosti tedy naznačují potenciální využití miRNA v medicíně díky jejich účinku při regulaci genové exprese.

1.3.2 Objev a historie miRNA

Počátky objevu miRNA pocházejí z roku 1993, kdy skupina vědců Lee *et al.* pozorovala, že heterochronní gen *lin-4*, důležitý pro správné načasování vývojových procesů u *Caenorhabditis elegans*, nekóduje protein, ale vede pouze k produkci dvou malých RNA transkriptů (Lee *et al.*, 1993). Následně bylo zjištěno, že tyto dva transkripty o přibližné délce 22 a 61 nukleotidů obsahují sekvence, které jsou komplementární k repetitivním sekvencím nacházejícím se v 3‘ UTR mRNA genu *lin-14*. Tento objev vedl k závěru, že mechanismus účinku genu *lin-4* může být zprostředkován interakcí miRNA–mRNA a může spočívat ve schopnosti genu *lin-4* negativně ovlivňovat gen *lin-14* na post-transkripční úrovni (Wightman *et al.*, 1991, 1993; Lee *et al.*, 1993).

O sedm let později byla opět na modelovém organismu *C. elegans* objevena podobná regulační molekula o přibližné délce 21 nukleotidů a byl následně identifikován gen *let-7* (Reinhart *et al.*, 2000). Autoři objevili, že v případě *let-7* se také jedná o heterochronní gen, který se účastní přechodu z pozdního larválního stádia do stádia dospělce potlačením genu

lin-41, a jeho mechanismus funkce je obdobný jako v případě regulace genu *lin-14* pomocí *lin-4* (Slack *et al.*, 2000; Reinhart *et al.*, 2000). Navíc bylo zjištěno, že RNA *let-7* je přítomna u velkého množství organismů, čímž bylo prokázáno, že tyto krátké ncRNA jsou fylogeneticky konzervovány a že přesahují rámec jednoho druhu, tedy že tento mechanismus regulace není omezen pouze na *C. elegans* (Pasquinelli *et al.*, 2000).

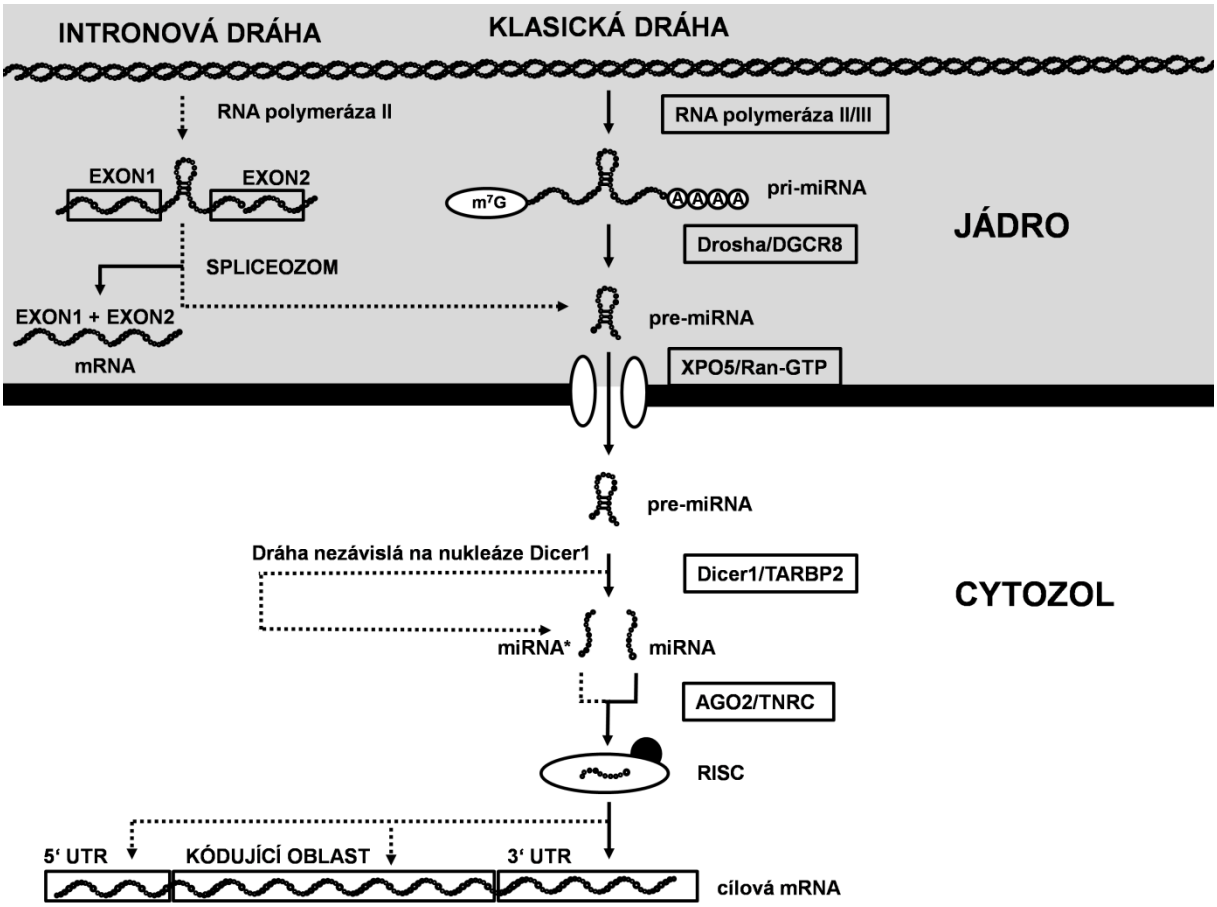
Během velmi krátké doby od těchto dvou významných objevů bylo publikováno několik prací týkajících se problematiky miRNA, které popisovaly objev více než sta nových miRNA molekul u hmyzu, červů, savců a lidských buněčných linií, za pomoci bioinformatických přístupů nebo klonování (Lagos-Quintana, 2001; Lau, 2001; Lee & Ambros, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2002). Vzhledem k narůstajícímu množství nově identifikovaných miRNA bylo potřeba vytvořit registr navržený pro katalogizaci objevených miRNA, jehož součástí také bylo přiřazování názvů jednotlivým miRNA (Griffiths-Jones, 2004). Současná verze databáze miRBase (http://www.mirbase.org/, v21, červen 2014) obsahuje téměř 29000 miRNA lokusů z 223 druhů, které dávají vznik téměř 36000 zralých miRNA, z čehož téměř 2600 jich bylo identifikováno u lidí.

Co se týče evolučního aspektu tohoto regulačního mechanismu, z výše uvedeného vyplývá, že jelikož jsou miRNA rozšířeny mezi různé biologické druhy a navíc jsou některé z nich mezi těmito druhy vysoce konzervovány, bude se pravděpodobně jednat o velmi starý mechanismus kontroly genové exprese. Bylo zjištěno, že velké množství klonovaných miRNA má své homology mezi blízce příbuznými druhy, konkrétně, že přibližně 50 % lidských a myších miRNA má své homology u ryb *Fugu rubripes* nebo *Danio rerio* a dále, že přibližně 25 % má své homology mezi druhy *C. elegans* nebo *Drosophila melanogaster* (Lagos-Quintana *et al.*, 2003). Ohromné množství těchto ncRNA molekul a jejich cílových genů společně s jejich fylogenetickou konzervovaností vedlo k závěru, že post-transkripční regulace zprostředkovaná krátkými molekulami miRNA je mnohem více rozšířená, než se původně předpokládalo (Lagos-Quintana, 2001; Lau, 2001).

1.3.3 Biogeneze a funkce miRNA

Genetické mapování genů pro miRNA ukázalo, že miRNA jsou odvozeny z mezigenových i genových oblastí, a to jak z intronů, tak z exonů, ale také to, že se tyto geny často nachází ve shlucích (Lagos-Quintana, 2001; Rodriguez *et al.*, 2004). Proces vzniku miRNA je komplikovaný a zahrnuje několik po sobě následujících procesů. Nejprve je gen přepsán RNA polymerázou II jako dlouhý primární transkript označovaný pri-miRNA

obsahující charakteristické struktury transkriptů RNA polymerázy II, tj. m^7G čepičku na 5‘ konci a polyadenylační signál na 3‘ konci (viz **Obrázek 3**) (Lee *et al.*, 2004). Byly však také publikovány studie, které potvrdily, že v případech, kdy se gen pro miRNA nacházel mezi Alu repeticemi, došlo k jeho přepisu pomocí RNA polymerázy III (Cai, 2004; Borchert *et al.*, 2006).



Obrázek 3. Biogeneze mikroRNA. Schéma zobrazuje biogenezi miRNA z pri-miRNA (klasická dráha) nebo z mirtronu (intronová dráha) až k funkčnímu miRNA řetězci, který se ve spojení s proteinovým komplexem RISC váže na cílovou mRNA.

U vzniklé pri-miRNA přítomné v jádře dochází k vytvoření vlásenkové struktury, která je následně zpracována pomocí mikroprocesorového komplexu tvořeného dvěma klíčovýma elementama, tj. dsRNA-vazebným proteinem DGCR8 (DGCR8 microprocessor complex subunit, který je také znám pod názvem Pasha u *D. melanogaster* a *C. elegans*) a endonukleázou třídy RNáza III, Drosha (Lee *et al.*, 2003; Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004). Nukleáza Drosha ve spojení s DGCR8 štěpí oba volné konce řetězce pri-miRNA u kořene vlásenky, čímž dojde ke vzniku meziproduktu o délce přibližně 70 nukleotidů, tzv.

prekurzorové miRNA (pre-miRNA) (Lee *et al.*, 2002, 2003; Zeng & Cullen, 2003). Zpracování pri-miRNA je také regulováno pomocí proteinů skupiny SMAD (small mothers against decapentaplegic), což jsou signální přenašeče TGFB/BMP signalizace, které usnadňují štěpení pri-miRNA molekul prováděné enzymem Drosha (Davis *et al.*, 2008, 2010). U obratlovců i bezobratlých však byla objevena i alternativní dráha pro zpracování pri-miRNA, která je nezávislá na enzymu Drosha (Ruby *et al.*, 2007; Berezikov *et al.*, 2007). Výchozí molekula pro výslednou pre-miRNA se od předchozího případu liší, je jí krátká vlásenková intronová struktura, nazývána mirtron, která využívá klasický sestřih (splicing), čímž se vyhne štěpení pomocí nukleázy Drosha. Ať je pre-miRNA výsledkem prvního nebo druhého procesu, v obou případech je následně transportována z jádra do cytoplazmy pro další zpracování pomocí XPO5 (exportin 5) za přítomnosti kofaktoru Ran-GTP (Yi, 2003).

Jakmile je pre-miRNA přítomná v cytoplazmě, je dalším krokem její zpracování druhou endonukleázou třídy RNáza III, Dicer1, která je opět asociována s proteinem vázajícím se na dsRNA, TARBP2 (TAR (HIV-1) RNA binding protein 2), což ve výsledku vede ke štěpení vlásenkové struktury pre-miRNA a vzniku dvouřetězcové molekuly miRNA o výsledné délce přibližně 22 nukleotidů (Bernstein *et al.*, 2001; Grishok *et al.*, 2001; Hutvagner, 2001; Chendrimada *et al.*, 2005). Avšak i v tomto případě byla objevena alternativní dráha biogeneze miRNA u obratlovců, nezávislá na enzymu Dicer1, která je zprostředkována proteinem AGO2 (argonaute RISC catalytic component 2), u které dochází k produkci zralé miRNA přímo z pre-miRNA (Cifuentes *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Yang & Lai, 2010). U výsledného duplexu miRNA jsou pomocí helikázy následně jednotlivá vlákna RNA od sebe oddělena, což vede ke vzniku dvou potenciálně funkčních miRNA. Tato dvě výsledná vlákna označována jako miRNA (hlavní vlákno) a miRNA* (vedlejší vlákno), nebo jako 5p miRNA a 3p miRNA, v závislosti na tom, ze kterého raménka pre-miRNA jsou odvozena, jsou následně zpracována rozdílným způsobem. Hlavní vlákno z původního miRNA:miRNA* duplexu je přednostně přesunuto do proteinového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), který se skládá z proteinů vážících dsRNA, TARBP2 a PRKRA (protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator; známý také pod názvem PACT), proteinu Dicer1, TNRC (trinucleotide repeat containing; známý také pod názvem GW182) a AGO2, který zprostředkovává katalytickou funkci výsledného nukleoproteinového komplexu RISC, na druhou stranu vedlejší vlákno miRNA* je většinou degradováno (Schwarz *et al.*, 2002, 2003; Khvorova *et al.*, 2003; Meister *et al.*, 2004; Liu, 2004; Liu *et al.*, 2005; Chendrimada *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Behm-Ansmant, 2006). Bylo ovšem také zjištěno, že některá velmi konzervovaná vedlejší vlákna miRNA* můžou být

také funkční, ačkoliv jejich zastoupení a celkový příspěvek do genové regulace je v poměru k hlavním vláknům miRNA spíše zanedbatelný (Yang *et al.*, 2011).

Jakmile je zralá miRNA spojena s proteinovým komplexem RISC, účastní se následně jeho navádění k 3‘ UTR cílové mRNA, kde se nachází místo vazby miRNA nazývané MRE (miRNA response element), což následně vede k dvěma možným situacím v závislosti na míře komplementarity mezi miRNA a mRNA: (1) v případě úplné komplementarity „seed“ sekvence dochází k degradaci cílové mRNA, nebo (2) v případě neúplné komplementarity dochází k inhibici translace cílové mRNA (Hammond *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2002; Pillai, 2005). Bylo však také pozorováno, že vazby na cílovou mRNA se kromě 5‘ oblasti, ve které se nachází „seed“ sekvence, účastní také 3‘ koncová oblast miRNA (Brennecke *et al.*, 2005). Autoři této studie vyvodili tři závěry: (1) miRNA je schopná regulace genové exprese i bez účasti vazby na jejím 3‘ konci, pokud je na jejím 5‘ konci komplementárních sedm nebo více nukleotidů s cílovou mRNA, (2) post-transkripční regulace pomocí miRNA je také možná v případě, kdy je komplementarita 5‘ konce s cílovou mRNA nižší, avšak je kompenzována zvýšenou komplementaritou 3‘ konce, naopak (3) ani úplná komplementarita 3‘ konce miRNA není sama o sobě dostatečná k tomu, aby vedla k potlačení genové exprese bez komplementarity na 5‘ konci miRNA. Podpůrná komplementarita na 3‘ konci miRNA je tedy spíše zodpovědná za rozdílnou specificitu cílových genů v rámci miRNA rodin, ve kterých jednotlivé miRNA molekuly mají velmi podobné sekvence, které však nejsou plně identické.

1.3.4 Svalově-specifické miRNA

V průběhu identifikace nových miRNA bylo zjištěno, že některé nejsou exprimovány všudypřítomně, ale tkáňově-specificky (Lee & Ambros, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2002). Bylo pozorováno, že miR-1 je exprimována pouze ve svalu, miR-122 pouze v játrech a miR-124 pouze v mozku. V současné době je osm miRNA považováno za svalově-specifické, jmenovitě se jedná o miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208a, miR-208b, miR-486 a miR-499 (Sempere *et al.*, 2004; van Rooij *et al.*, 2007, 2009; Small *et al.*, 2010). Tyto miRNA jsou exprimovány jak v srdečním, tak v kosterním svalu, kromě miR-206, která je exprimována výhradně v SM, a miR-208a, která je exprimována výhradně v srdečním svalu. Následně bylo experimentálně zjištěno, že tyto miRNA významně dominují ve svalové tkáni a to jak expresí, tak i funkcí, a že hrají klíčovou roli v procesu myogeneze a dalších aspektech svalové biologie cílením genů, které se účastní regulace vývojového osudu svalových buněk,

buněčné proliferace, diferenciace a regenerace, ale také dalších funkcí ovlivňujících neuro-muskulární spoje, angiogenezi nebo apoptózu (Kirby *et al.*, 2015). Exprese svalově-specifických miRNA je často řízena myogenními transkripčními faktory MRF, MYOD1, MYF5, MYOG, MYF6, MEF2, SRF (serum response factor), MLK1 (megakaryoblastic leukemia (translocation) 1) a dalšími (Zhao *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Rosenberg *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Sweetman *et al.*, 2008; Small *et al.*, 2010).

Mezi nejlépe prozkoumané svalově-specifické miRNA patří miR-1, miR-133a/b a miR-206, které jsou kódovány ve shlucích a dávají vznik tzv. polycistronnímu transkriptu, konkrétně miR-1-1/miR-133a-2 (lokus 20q13.33), miR-1-2/miR-133a-1 (lokus 18q11.2) a miR-206/miR-133b (lokus 6p12.2) (Nohata *et al.*, 2012). Ačkoliv se tyto miRNA nachází v odlišných lokusech v genomu, produkují velmi podobné miRNA. Konkrétně: (1) zralá miR-1-1 a miR-1-2 mají identické sekvence, stejně jako miR-133a-1 a miR-133a-2, (2) miR-133a se liší od miR-133b pouze v jednom nukleotidu na 3‘ konci a (3) miR-1 se liší od miR-206 ve čtyřech nukleotidech v 3‘ oblasti, nicméně sdílí stejnou „seed“ sekvenci.

Vysoká sekvenční podobnost mezi určitými miRNA může vést k redundanci cílových genů, což je případ i výše popsaného genu *FSTL1*, který je cílen silně exprimovanými miR-1 a miR-206 (Rosenberg *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2012). Svalově-specifické miRNA však nemusí působit pouze ve svalu, jelikož jsou přítomny i extracelulárně a byly detekovány jak v krevním oběhu, tak v různých tělních tekutinách, kde jsou na rozdíl od ostatních RNA velmi stabilní (Weber *et al.*, 2010).

1.4 Vliv genetické variability na vazbu mikroRNA

Jak bylo uvedeno výše, regulace molekulami miRNA je založena na dostatečné vzájemné komplementaritě mezi miRNA a mRNA. Jakákoliv změna v sekvenci DNA, tedy i běžná sekvenční varianta, tj. mutace či polymorfismus, může vést ke ztrátě současného a/nebo k zisku nového nelegitimního vazebného místa pro specifické miRNA, což se může výsledně promítnout do změny hladiny mRNA a proteinu cílového genu (Georges *et al.*, 2006). Autoři Georges *et al*. pozorovali, že polymorfismus přítomný v 3‘ UTR genu *MSTN* vedl ke vzniku nového vazebného místa pro miR-1 a miR-206, tedy silně exprimované miRNA v SM, a následné svalové hypertrofii u ovcí. Autoři tak experimentálně prokázali, že genetická variabilita v 3‘ UTR genu v oblastech vazebných míst pro miRNA může vést ke vzniku nové fenotypové variability.

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bylo zjištěno, že gen pro FSTL1 je exprimován téměř ve všech tkáních dospělého člověka. Při jeho objevu byla zjištěna jeho homologie s genem pro FST, dobře popsaným agonistou svalového růstu, se kterým sdílí Aktivin-vázající FS doménu a schopnost interagovat s členy TGFB superrodiny. FSTL1 je také inhibován svalově-specifickými miRNA, tj. miR-1 a miR-206, které hrají klíčovou roli ve vývoji, růstu a údržbě SM. Dále bylo zjištěno, že genetická variabilita v 3‘ UTR genu může vést ke vzniku nebo ztrátě vazebného místa pro miRNA, což se může promítnout do množství mRNA a proteinu. Ačkoliv bylo publikováno několik studií zkoumajících asociaci genu *FSTL1* se svalem, jeho fyziologická funkce v současné době stále není plně objasněna.

Hlavní cíle této práce jsou:

1. Výběr vhodného genu asociovaného s SM, který je regulován pomocí miRNA (*FSTL1*)
2. Prozkoumat genetickou variabilitu v 3‘ UTR tohoto genu pro možné kandidátní polymorfismy spojené se ziskem nebo ztrátou vazebného místa pro miRNA, které by mohly vést ke snížené/zvýšené expresi mRNA a proteinu
3. Zhodnocení potenciálu vybraného SNP pro predikci celkového množství SMM

Podcíle této práce jsou:

1. Vytvoření kohorty výkonnostních sportovců v různém typu tréninku (aerobní vytrvalostní, explozivní silový, hypertrofický)
2. Restrikční analýza vybraného kandidátního polymorfismu a stanovení příslušných genotypů u:
   a) Běžné obézní i neobézní české populace
   b) Vytrvalostních i silových atletů v tréninku
3. Analýza výsledných genotypů a stanovení vlivu genetické variability ve vybraném genu zejména v souvislosti se změnou SMM, ale i s dalšími zkoumanými charakteristikami fyzické aktivity a antropometrickými znaky

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Subjekty studie

3.1.1 Kohorta obézních a neobézních jedinců (OB)

Pro účely této diplomové práce byla využita kohorta 183 obézních a neobézních, vzájemně nepříbuzných, bělochů z České republiky. Po seznámení s protokolem studie podepsali jedinci písemný informovaný souhlas pro účast v této studii, tyto dokumenty byly následně archivovány. Všechny prováděné výzkumy byly v souladu se zásadami Helsinské deklarace a všechny studijní protokoly týkající se práce s lidskými subjekty byly schváleny Etickou komisí Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Všichni jedinci účastnící se této studie byli přijati na základě masové mediální kampaně prováděné v Jihomoravském kraji. Výběrová kritéria pro začlenění do této studie byla přejata ze studie Ma *et al*. (Ma *et al.*, 2003).

Vybraná skupina subjektů zahrnovala 183 jedinců, z toho 41 můžu a 142 žen, průměrný věk skupiny byl 50,63 let a věkový rozsah byl 20,80–72,90 let. Mezi další fenotypové charakteristiky studované v této diplomové práci byly zahrnuty následující: celkové množství tělesného tuku, celkové množství tělesné vody, celkové množství hmoty kosterního svalu (SMM), výška, váha, BMI (body mass index), procento celkového množství tělesného tuku, procento celkového množství tělesné vody, procento celkového množství hmoty kosterního svalu (pTBSMM) a aritmetický (cal.AM) a geometrický (cal.GM) průměr energetického výdeje odhadnutého na základě počtu kroků v průběhu jednoho týdne.

Výše uvedená měření provedli zkušení nutriční specialisté. Stanovení tělesného složení bylo provedeno pomocí bioelektrické impedanční analýzy s využitím jedno-frekvenčního bioimpedančního analyzéru (Bodystat Ltd, Douglas, Isle of Man, UK). Měření byla provedena u subjektů v poloze vleže na zádech. Hmotnost subjektů, měřená pouze v lehkém oblečení bez bot, byla stanovena na kalibrovaných váhách a výška byla měřena pomocí kalibrovaného stadiometru.

3.1.2 Kohorta výkonnostních sportovců v různém typu tréninku (SPO)

Pro účely této diplomové práce byla dále využita kohorta 31 vzájemně nepříbuzných, bělošských atletů z České republiky. Po seznámení s protokolem studie podepsali jedinci

písemný informovaný souhlas pro účast v této studii, tyto dokumenty byly následně archivovány. Všechny prováděné výzkumy byly v souladu se zásadami Helsinské deklarace a všechny studijní protokoly týkající se práce s lidskými subjekty byly schváleny Etickou komisí Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Všichni jedinci účastnící se této studie byli pečlivě vybráni na základě jimi prováděného typu tréninku (aerobní vytrvalostní, explozivní silový, hypertrofický) na Katedře atletiky, plavání a sportů v přírodě na Fakultě sportovních studií Masarykovy univerzity v Brně.

Vybraná skupina subjektů zahrnovala 31 mužů rozdělených do tří skupin podle prováděného typu tréninku (aerobní vytrvalostní, explozivní silový, hypertrofický), průměrný věk skupiny byl 22,39 let a věkový rozsah byl 19,00–40,00 let. Před zahájením tréninkového režimu bylo provedeno stanovení fenotypových charakteristik tělesného složení u následujících parametrů: celkové množství tělesného tuku, celkové množství tělesné vody, SMM, výška, váha, BMI, procento celkového množství tělesného tuku, procento celkového množství tělesné vody a pTBSMM.

Výše uvedená měření byla provedena za účasti zkušených odborníků. Stanovení tělesného složení bylo provedeno pomocí přístroje InBody720 (Biospace Co., Ltd., Japonsko). Měření byla provedena u subjektů v poloze vestoje. Měření váhy pomocí InBody720 byla provedena v lehkém oblečení bez bot. Výška byla měřena pomocí kalibrovaného stadiometru.

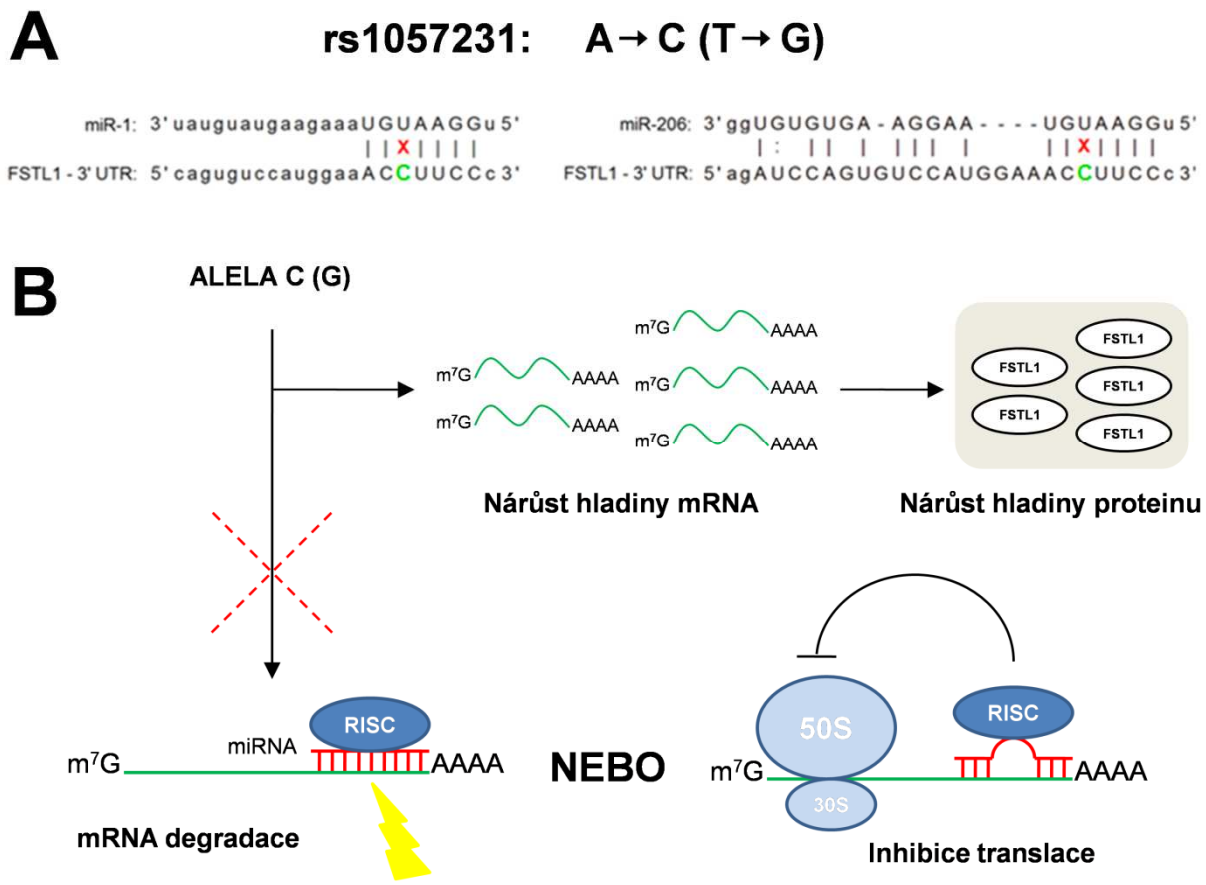
3.2 Kandidátní geny a genetické varianty

Selekční kritéria pro výběr vhodného genu zkoumaného v této diplomové práci byla založena na následujících požadavcích: (1) pro vybraný gen musí být zjištěna regulace pomocí miRNA na základě bioinformatických přístupů a experimentálně ověřených dat, (2) vybraný gen musí mít vliv na procesy vývoje nebo růstu SM na základě jeho potenciálních nebo známých funkcí či regulačních mechanismů a (3) pro vybraný gen musí být popsána asociace s SM.

Po výběru vhodného kandidátního genu byla prozkoumána jeho 3‘ UTR, obsahující vazná místa pro miRNA, pro vhodné genetické varianty. Za tímto účelem bylo využito online databáze obsahující jednonukleotidové polymorfismy (SNP) související s vazbou miRNA, tj. www.bioguo.org/miRNASNP (Gong *et al.*, 2012). Selekční kritéria pro výběr vhodného SNP byla založena na následujících požadavcích: (1) vybraný SNP se musí nacházet v místě vazby

miRNA, (2) vybraný SNP musí být schopen způsobit ztrátu současného a/nebo zisk nového nelegitimního vazebného místa pro specifické miRNA, (3) změna vazebné energie miRNA v přítomnosti SNP musí být dostatečné velká, aby se tato změna významně projevila na výsledné hladině proteinu a (4) populační frekvence vybraného SNP musí být v bělošské populaci dostatečně velká, aby bylo možné statisticky zhodnotit vliv této genetické varianty.

Na základě výše uvedených kritérií byla provedena genotypizace u SNP rs1057231 nacházejícího se v 3‘ UTR genu pro FSTL1. Na základě bioinformatických předpovědí bylo zjištěno, že přítomnost alely G tohoto SNP vede ke ztrátě vazebného místa pro miR-1, miR-206 a miR-613, což se může výsledně promítnout do změny hladiny mRNA a proteinu cílového genu (viz **Obrázek 4**).



Obrázek 4. Vliv SNP rs1057231 v genu *FSTL1* na vazbu miRNA. A: Obrázek znázorňuje přítomnost alely G (C) a její vliv na ztrátu vazebného místa pro mi-1 a miR-206. **B:** Obrázek znázorňuje situaci, kdy ztráta vazebného místa pro miR-1 a miR-206 vede k potlačení inhibice pomocí miRNA, což může následně vést k nárůstu hladiny mRNA a proteinu.

3.3 Izolace DNA

3.3.1 Izolace DNA ze slin

V případě kohorty OB byla DNA izolována ze slin. Od subjektů bylo odebráno 5 ml slin, které byly uchovávány při teplotě do 8 °C a byly zpracovány nejpozději do pěti dnů od data odběru. Sliny byly nejprve centrifugovány po dobu 15 min. při 5000 otáčkách/min. Supernatant byl odebrán a k sedimentu byl přidán fyziologický roztok, se kterým byl následně sediment protřepáván pro odstranění hlenu a nečistot. Ke každému vzorku bylo následně přidáno 30 µl Proteinázy K. Horní supernatant nad blankou buněk byl následně odebrán do nové zkumavky, kde byl pro vysrážení DNA přidán 2-propanol. Tato směs byla protřepávána na třepačce po dobu 10 min. Vysrážená DNA byla následně centrifugována po dobu 15 min. při 8000 otáčkách/min. 2-propanol byl odlit a DNA byla rozpuštěna v Tris (tris(hydroxymethyl)aminometan)/EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina) pufru (TE pufr). Naředěná DNA na koncentraci 50 ng/µl byla uchovávána při teplotě 4 °C, zásobní DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

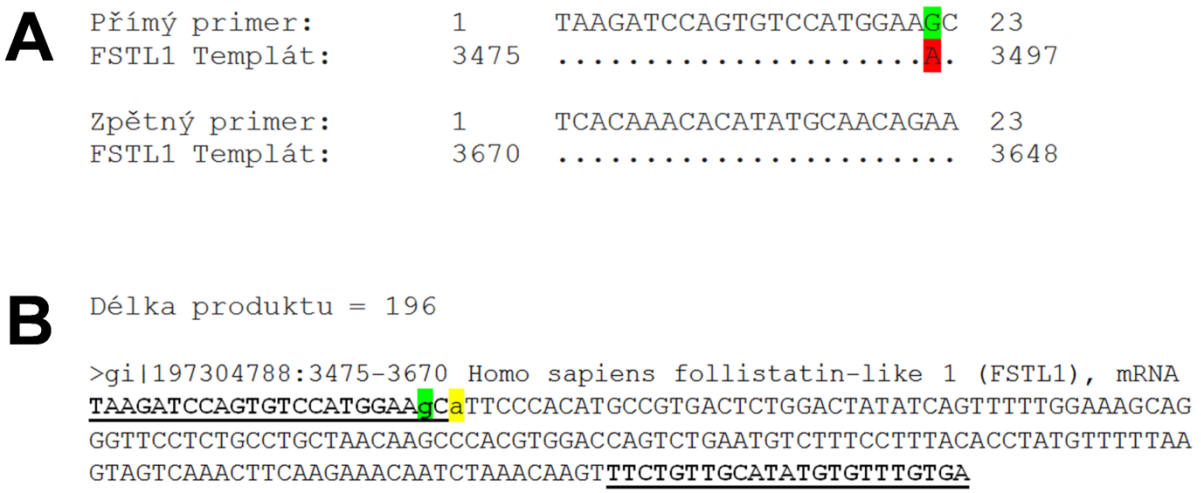
3.3.2 Izolace DNA z periferní krve

V případě kohorty SPO byla DNA izolována z periferní krve. Od subjektů bylo odebráno 5 ml venózní krve do kontejnerku obsahujícího 0,3 ml 0,5M EDTA. Ke vzorku bylo přidáno 20 ml chlazené demineralizované vody a vzorek byl zamražen při -20 °C. Před izolací byly vzorky rozmraženy ve vlažné vodě. Rozmražené vzorky byly centrifugovány po dobu 10 min. při 5000 otáčkách/min. Supernatant byl odstraněn, k sedimentu buněk bylo přidáno 25-30 ml chlazené destilované vody, vzorek byl protřepán a následně centrifugován po dobu 10 min. při 5000 otáčkách/min. Supernatant byl odstraněn, k sedimentu bylo přidáno 20-25 ml chlazeného fyziologického roztoku, vzorek byl protřepán a následně centrifugován po dobu 10 min. při 5000 otáčkách/min. Supernatant byl odlit a sediment byl promýván nižším množstvím fyziologického roztoku, aby byly odstraněny zbytky erytrocytů a hemu. K promytému sedimentu bylo přidáno 0,5 ml chlazeného fyziologického roztoku, vzorek byl promíchán a přenesen do nové zkumavky. Následně byly přidány 3 ml roztoku FASSANO (složení: 0,2M NaCl, 0,02M EDTA, 0,04M Tris a 0,5% SDS (dodecylsíran sodný)) a 20 µl Proteinázy K. Vzorek byl následně inkubován v termostatu při 37 °C přes noc nebo při 55 °C po dobu 2 hodin. Zkumavky vytažené z termostatu byly inkubovány po dobu 20 min. při pokojové teplotě a následně k nim bylo přidáno 1,4 ml 5M NaCl a stejný objem chloroformu

jako vzorku. Zkumavky byly 2 hodiny promíchávány na třepačce a následně centrifugovány po dobu 15 min. při 8000 otáčkách/min. Byla odebrána horní fáze a byl přidán stejný podíl chlazeného 2-propanolu jako vzorku. Jemným obrácením zkumavky byla vysrážena DNA, která byla namotána na sterilní skleněný háček a opláchnuta v 70% ethanolu. DNA byla následně přenesena do nové zkumavky s TE pufrem a umístěna po dobu 5 dnů do lednice při teplotě 4 °C za občasného promíchávání, aby se DNA rozpustila. Po rozpuštění byla DNA naředěna demineralizovanou vodou o pH 7,2–7,4 na výslednou koncentraci 50 ng/µl. Naředěná DNA byla uchovávána při teplotě 4 °C, zásobní DNA s TE pufrem byla uchovávána při teplotě -20 °C.

3.4 Návrh primerů a restrikčního enzymu

Genotypizace byla provedena pomocí klasické metody PCR, pro kterou bylo potřeba navrhnout odpovídající primery. Návrh primerů pro vybraný SNP G/T (C/A) v genu *FSTL1* byl proveden podle následujících kroků. Nejprve byly navrženy primery pomocí programu Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) tak, aby výsledný amplikon pokrýval požadovanou oblast genu s vybraným SNP. U navržených primerů byla následně ověřena jejich délka, specificita, poměr obsahu CG párů, teplota tání, stabilita 3‘ konce a tvorba homoduplexů či heteroduplexů, s využitím programu Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Vybrané primery byly následně zkontrolovány v programu OligoAnalyzer 3.1 (http://eu.idtdna.com/calc/analyzer). Poté byla navržena vhodná restrikční endonukleáza; enzym byl vybrán pomocí programu NEBcutter V2.0 (http://nc2.neb.com/NEBcutter2/). Při hledání optimální endonukleázy bylo zjištěno, že žádný enzym nemá vhodnou štěpící sekvenci v blízkosti vybraného SNP, z tohoto důvodu byly navrženy tzv. mismatch primery. V případě mismatch primeru došlo k záměně nukleotidu v blízkosti štěpného místa, což vedlo ke vzniku požadované sekvence (viz **Obrázek 5**). Pro tuto sekvenci byla následně dohledána endonukleáza s odpovídajícím cílovým místem – BsmI. Výsledně byly navrženy přímý a zpětný primer o délce 23 nukleotidů, které dávaly vznik produktu PCR o délce 196 bp.



Obrázek 5. Navržené primery pro FSTL1. A: Obrázek znázorňuje přímý mismatch primer a zpětný primer. V případě přímého primeru byl nahrazen guanin (zeleně) na pozici 22 místo původního adeninu (červeně), což dalo vznik požadovanému štěpnému místu pro BsmI. **B:** Obrázek znázorňuje výsledný produkt PCR reakce o délce 196 bp. Primery jsou značeny tučně a podtrženy, nahrazený guanin mismatch primeru je značený zeleně a polymorfní místo je značeno žlutě.

3.5 PCR

Navržené primery byly následně využity pro PCR. Pro tuto amplifikační reakci byl použit Master-mix (MM) s mírně odlišným složením pro kohortu OB (viz **Tabulku 1**) a kohortu SPO (viz **Tabulku 2**). Objem jednotlivých složek MM na jeden vzorek byl následující:

Tabulka 1. Složení Master-mixu pro PCR u kohorty OB

Složky:	**Množství:**
destilovaná voda	7,05 µl
PCR pufr (10x *Taq* buffer)	1,50 µl
$MgCl_2$	1,50 µl
Přímý primer	0,75 µl
Zpětný primer	0,75 µl
Deoxyribonukleotidy (dNTP)	0,30 µl
Taq DNA polymeráza (5 U/µl)	0,15 µl

Tabulka 2. Složení Master-mixu pro PCR u kohorty SPO

Složky:	**Množství:**
destilovaná voda	6,55 µl
PCR pufr (10x *Taq* buffer)	1,50 µl
$MgCl_2$	2,00 µl
Přímý primer	0,75 µl
Zpětný primer	0,75 µl
Deoxyribonukleotidy (dNTP)	0,30 µl
Taq DNA polymeráza (5 U/µl)	0,15 µl

Výsledný MM o objemu 12 µl byl promíchán na vortexu a k tomuto objemu byly následně přidány 3 µl DNA u kohorty OB i u kohorty SPO. Výsledná směs MM a DNA byla zakápnuta minerálním olejem pro zabránění odpařování vzorku. Směs byla následně umístěna do termocykleru LabCycler (SENSOQUEST, Heidelberg, Německo). Jednotlivé kroky PCR, a doba jejich trvání, jsou popsány v následující tabulce (viz **Tabulku 3**):

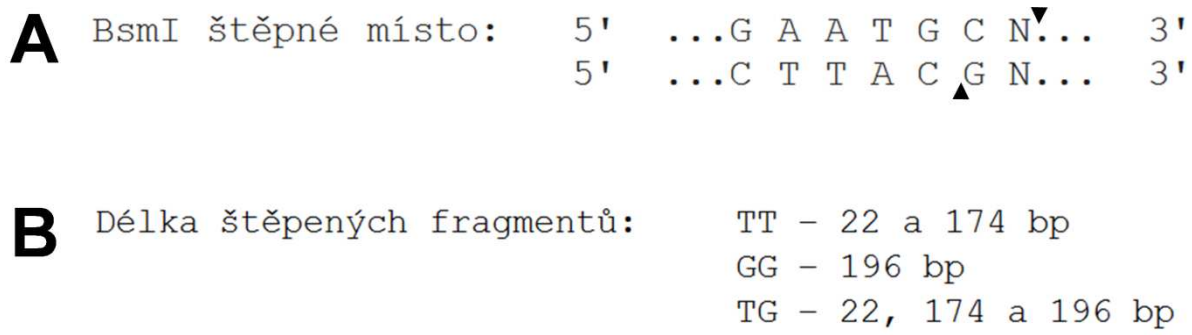
Tabulka 3. Jednotlivé kroky programu pro PCR

Krok:	**Teplota:**	**Doba trvání:**	**Počet opakování**
Počáteční denaturace	95 °C	10 min	1x
Denaturace	95 °C	20 s	
Nasedání primerů	62 °C	30 s	14x
Prodloužení primerů	72 °C	30 s	
Denaturace	95 °C	30 s	
Nasedání primerů	50 °C	30 s	20x
Prodloužení primerů	72 °C	30 s	
Závěrečné prodloužení primerů	72 °C	5 min	1x
Závěrečné ochlazení	15 °C	10 min	1x

Po provedení PCR bylo z objemu 15 µl odebráno 5 µl pro účely ověření amplifikace produktu pomocí agarózové elektroforézy (blíže popsané v kapitole 3.8). U vzorků, u kterých amplifikace nebyla úspěšná, tj. nebyl detekován žádný produkt, byla PCR optimalizována a provedena opakovaně s pozměněnými objemy složek – $MgCl_2$, destilované vody a DNA.

3.6 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

Vzniklé produkty amplifikační reakce o délce 196 bp byly následně štěpeny pomocí endonukleázy BsmI, která byla vybrána pomocí programu NEBcutter V2.0 (viz kapitolu 3.5). Cílová sekvence tohoto enzymu a délky vzniklých produktů jsou uvedeny v **Obrázku 6**.



Obrázek 6. Štěpné místo nukleázy BsmI a výsledné produkty štěpení. A: Obrázek znázorňuje sekvenci rozpoznávanou endonukleázou BsmI. **B:** Obrázek znázorňuje výsledné délky produktů štěpení endonukleázou BsmI a odpovídající genotypy.

Pro tuto restrikční reakci byl použit shodný MM pro kohortu OB i pro kohortu SPO (viz **Tabulku 4**). Objem jednotlivých složek MM na jeden vzorek byl následující:

Tabulka 4. Složení Master-mixu pro restrikční analýzu

Složky:	**Množství:**
destilovaná voda	7,75 µl
pufr (10x CutSmart® buffer)	2,00 µl
enzym (BsmI - 2,5 U)	0,25 µl

Výsledný MM o objemu 10 µl byl krátce centrifugován a následně přidán k 10 µl směsi s produktem PCR. Výsledná směs o objemu 20 µl byla přes noc umístěna do termostatu s teplotou 37 °C.

3.7 Agarózová elektroforéza

Po amplifikaci byla provedena elektroforéza za účelem detekce produktů a po restrikčním štěpení byla provedena elektroforéza pro odečtení výsledných genotypů. V obou případech byl využit 3% agarózový gel. Gel byl připraven rozvařením agarózy v 1x Tris–Borate–EDTA pufru (TBE pufr). TBE pufr byl připraven smícháním 90 mM Tris, 90 mM kyseliny borité, 1 mM EDTA a miliQ vody. Do rozvařené agarózy v TBE pufru byl přidán ethidium bromid o koncentraci 0,2 µl na 1 ml agarózového gelu. Etidium bromid je interkalační barvivo, které se váže na DNA a umožní její pozdější vizualizaci pod UV světlem. Do vaničky, do které byl nalit rozvařený gel, byly umístěny hřebínky, které daly vznik jamkám. Ztuhlý gel byl následně umístěn do elektroforetické vaničky a ponořen do 1x TBE pufru. Vzorek DNA nanášený do jamek byl před samotným nanesením smíchán s nanášecím pufrem, který byl tvořen 20% ficollem a 0,25% bromfenolovou modří. Elektroforéza následně probíhala po dobu 30 minut při 100 V. Po proběhnutí elektroforézy byly DNA fragmenty vizualizovaný pod UV světlem a vyfotografovány. Na základě fotografií byly odečteny výsledné genotypy.

3.8 Statistická analýza

Nejprve bylo statisticky ověřeno, zda se distribuce genotypů nacházela v Hardy–Weinbergově rovnováze. Pro tuto analýzu byly využity asymptotický χ^2 test a exaktní test. Subjekty byly následně rozděleny do skupin podle pohlaví (muž/žena) a genotypů (TT/TG/GG) a nezávislost těchto proměnných byla testována s využitím Pearsonova testu. V případě, že to bylo možné, byla nejprve určena normalita distribuce znaku pomocí Pearsonova a D'Agostinova testu. Pokud proměnné nevykazovaly normální rozložení, byla provedena jejich logaritmická a odmocninová transformace a normalita byla opakovaně testována. Mimo využití klasických statistických testů byla normalita také hodnocena graficky s využitím histogramů a kvantil–kvantilových grafů. Meziskupinová porovnání byla testována v závislosti na pohlaví pomocí t-testu a Mann–Whitneyho testu a v závislosti na genotypu pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) a Kruskal–Wallisova testu. Korelace mezi hodnotami byla stanovena pomocí matricového diagramu a Spearmanova korelačního koeficientu.

Pro identifikaci genetických a negenetických proměnných, které by mohly přispívat k předpovědi antropometrického fenotypu, byl v případě kohorty OB využit zpětný krokový regresní model. Tento model zahrnuje postupné odstraňování vstupních proměnných, které

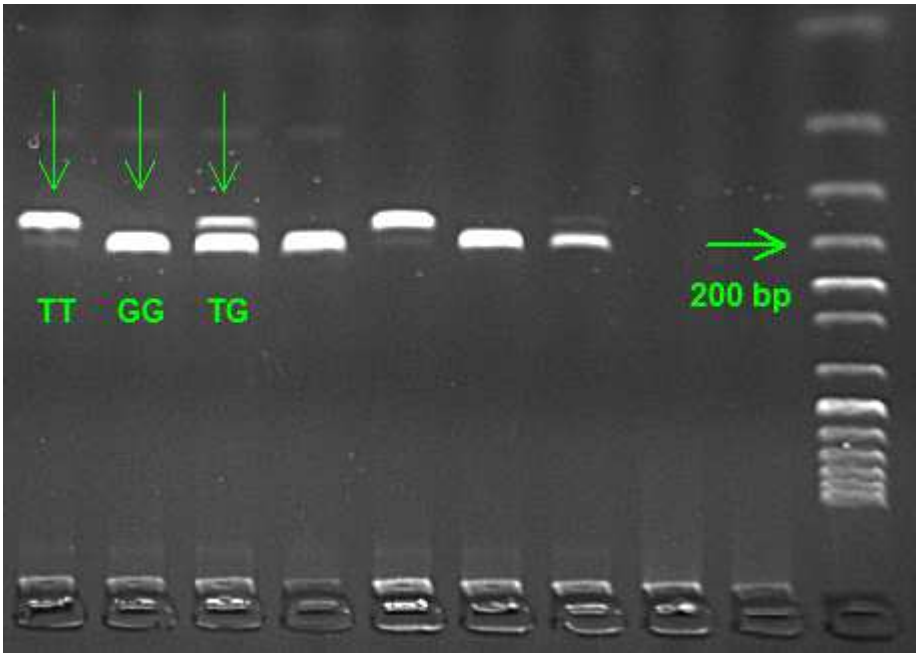
jsou vyřazovány jedna po druhé, čímž dojde k vytvoření regresního modelu, ve kterém je závislá proměnná (např. SMM) charakterizována jako lineární kombinace nezávislých proměnných (tj. antropometrických znaků a genotypů).

Pro popisné účely jsou průměrné hodnoty prezentovány v netransformovaných hodnotách. Všechny výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky, pokud není uvedeno jinak. Statistická analýza byla zpracována s využitím R programu, v. 3.1.2. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné a hodnoty $0,05 < p < 0,1$ byly statisticky na hraně významnosti.

4 VÝSLEDKY

4.1 Restrikční analýza a genotypizace

Restrikční analýza SNP rs1057231 byla provedena u 183 jedinců z kohorty OB a u 31 jedinců z kohorty SPO. Amplifikovaný produkt měl délku 196 bp, v případě přítomnosti alely G, která má vliv na ztrátu vazebného místa pro miRNA, nedocházelo ke štěpení amplikonu, naopak v přítomnosti alely T docházelo ke štěpení na fragmenty o délce 174 bp a 22 bp (viz **Obrázek 6**). Z fotografií pořízených po ukončení elektroforézy, provedené po restrikčním štěpení, byly odečteny genotypy (viz **Obrázek 7**).



Obrázek 7. Fragmenty DNA po štěpení endonukleázou BsmI. V první jamce (vlevo) se nachází produkty o délce 174 bp (genotyp TT), v druhé jamce se nachází neštěpené produkty o délce 196 bp (genotyp GG) a ve třetí jamce se nachází produkty o délce 196 bp + 174 bp (genotyp TG). Do desáté jamky (vpravo) byl nanesen 50 bp žebříček pro kontrolu délek fragmentů DNA, zelená šipka u žebříčku znázorňuje fragmenty o délce 200 bp.

4.2 Základní charakteristika studovaných jedinců

Základní popisná charakteristika studovaných jedinců, odrážející demografické a antropometrické charakteristiky, společně s charakteristikami fyzické aktivity, v závislosti na *FSTL1* genotypu je pro kohortu OB uvedena v **Tabulce 5**, a pro kohortu SPO je uvedena v **Tabulce 6**.

Tabulka 5. Základní charakteristiky jedinců z kohorty OB v souvislosti s *FSTL1* genotypy

	Jednotka	Dostupné hodnoty	Genotyp			Všechny skupiny	
			TT	TG	GG		
		n	n = 48	n = 92	n = 43	n = 183	*p*-hodnota
Celkové množství tělesného tuku	kg	183	33,56 ± 14,43	34,92 ± 14,35	34,37 ± 12,74	34,43 ± 13,94	0,878
Celkové množství tělesné vody	kg	183	40,84 ± 7,63	40,77 ± 9,04	38,3 ± 7,93	40,21 ± 8,46	0,189
Celkové množství hmoty kosterního svalu	kg	183	31,05 ± 6,31	30,92 ± 7,31	28,92 ± 6,5	30,49 ± 6,89	0,183
Výška	cm	183	169,29 ± 6,67	169,05 ± 10,05	167,03 ± 8,73	168,64 ± 8,96	0,352
Váha	kg	183	89,24 ± 20,87	90,37 ± 21,97	86,5 ± 18,47	89,16 ± 20,86	0,695
Věk	rok	182	50,95 ± 13,66	50,04 ± 14,48	51,58 ± 14,12	50,63 ± 14,12	0,778
body mass index	kg/m^2	183	31 ± 6,38	31,65 ± 7,36	30,68 ± 6,15	31,25 ± 6,82	0,822
% celkového množství tělesného tuku	-	183	0,36 ± 0,09	0,37 ± 0,1	0,39 ± 0,1	0,38 ± 0,09	0,379
% celkového množství tělesné vody	-	183	0,47 ± 0,07	0,46 ± 0,07	0,45 ± 0,07	0,46 ± 0,07	0,450
% celkového množství hmoty kosterního svalu	-	183	0,35 ± 0,05	0,35 ± 0,05	0,34 ± 0,05	0,35 ± 0,05	0,350
Aritmetický průměr energetického výdeje	kkal	145	303,47 ± 135,01	332,6 ± 170,03	381,57 ± 150,69	336,05 ± 158,06	0,066
Geometrický průměr energetického výdeje	kkal	145	274,09 ± 134,2	302,69 ± 143,73	356,74 ± 142,38	307,47 ± 143,04	0,028

Poznámky: v případě věku bylo testováno pouze 182 subjektů z celkových 183, z důvodu chybějících dat u 1 jedince. V případě aritmetického (cal.AM) a geometrického (cal.GM) průměru energetického výdeje bylo testováno pouze 145 subjektů z celkových 183, z důvodu chybějících dat u 38 jedinců.

Tabulka 6. Základní charakteristiky jedinců z kohorty SPO v souvislosti s *FSTL1* genotypy

	Jednotka	Dostupné hodnoty	Genotyp			Všechny skupiny	
			TT	TG	GG		
		n	n = 6	n = 15	n = 10	n = 31	*p*-hodnota
Celkové množství tělesného tuku	kg	31	7,8 ± 3,0	7,7 ± 5,2	7,7 ± 2,3	7,7 ± 4,0	0,753
Celkové množství tělesné vody	kg	31	49,0 ± 2,7	50,8 ± 2,6	50,4 ± 7,1	50,3 ± 4,5	0,305
Celkové množství hmoty kosterního svalu	kg	31	38,2 ± 2,2	39,7 ± 2,2	39,4 ± 5,7	39,3 ± 3,6	0,312
Výška	cm	31	179,8 ± 7,7	183,5 ± 7,1	182,3 ± 8,2	182,4 ± 7,4	0,531
Váha	kg	31	74,6 ± 5,0	77,1 ± 6,0	76,5 ± 10,5	76,4 ± 7,4	0,798
Věk	rok	31	21,8 ± 2,5	23,0 ± 5,2	21,8 ± 2,7	22,4 ± 4,0	0,867
Body mass index	kg/m^2	31	23,1 ± 1,7	23,1 ± 2,7	22,9 ± 1,6	23,0 ± 2,1	0,980
% celkového množství tělesného tuku	-	31	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,06	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,04	0,955
% celkového množství tělesné vody	-	31	0,66 ± 0,03	0,66 ± 0,04	0,66 ± 0,02	0,66 ± 0,03	0,795
% celkového množství hmoty kosterního svalu	-	31	0,51 ± 0,02	0,52 ± 0,03	0,52 ± 0,2	0,52 ± 0,03	0,928

Na základě asymptotického χ^2 testu a exaktního testu bylo prokázáno, že se distribuce genotypů nachází v Hardy–Weinbergově rovnováze a to jak pro kohortu OB, tak pro kohortu SPO. Následně byla prokázána nezávislost proměnných (pohlaví a genotypu) pomocí Pearsonova a Fisherova testu.

4.3 Žádná asociace FSTL1 s hmotou kosterního svalu u kohorty OB

Nejprve bylo analyzováno množství SMM a pTBSMM s ohledem na pohlaví. Podle očekávání bylo pozorováno významně více SMM u mužů než u žen (SMM: muž vs žena, 40,03 ± 5,67 vs 27,73 ± 4,25, $p < 0{,}001$). Obdobné výsledky byly pozorovány i u pTBSMM (pTBSMM: muž vs žena, 0,39 ± 0,05 vs 0,33 ± 0,05, $p < 0{,}001$). Následně byla testována má hypotéza, tj. zda rozdílné genotypy SNP rs1057231 genu *FSTL1* mají vliv na SMM a pTBSMM. Když byly porovnány jednotlivé *FSTL1* genotypy mezi celou kohortou, nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny ani změny na hladiny statistické významnosti u SMM (SMM: TT vs TG vs GG, 31,05 ± 6,31 vs 30,92 ± 7,31 vs 28,92 ± 6,5, $p = 0{,}183$) nebo u pTBSMM (pTBSMM: TT vs TG vs GG, 0,35 ± 0,05 vs 0,35 ± 0,05 vs 0,34 ± 0,05, $p = 0{,}350$). Následně byly jednotlivé genotypy zkoumaného SNP porovnány pro hodnoty SMM a pTBSMM u každého pohlaví zvlášť (viz **Tabulku 7**), nicméně ani zde nebyly zjištěny statisticky významné změny u SMM jak u mužů (SMM u mužů: TT vs TG vs GG, 38,13 ± 4,87 vs 41,46 ± 6,12 vs 39,52 ± 5,35), tak u žen (SMM u žen: TT vs TG vs GG, 28,42 ± 4,52 vs 28 ± 4,29 vs 26,5 ± 3,72). Situace byla analogická v případě změn u pTBSMM u můžu (pTBSMM u mužů: TT vs TG vs GG, 0,39 ± 0,05 vs 0,39 ± 0,05 vs 0,41 ± 0,05) i u žen (pTBSMM u žen: TT vs TG vs GG, 0,34 ± 0,05 vs 0,34 ± 0,05 vs 0,32 ± 0,04).

Následně byl vytvořen zpětný krokový regresní model (detailněji popsaný v kapitole 3.9) využívající SMM jako závislou proměnnou a pohlaví, věk, váhu, cal.GM a *FSTL1* genotyp jako nezávislé proměnné. Ani v tomto případě však nebyla pozorována statisticky významná prediktivní úloha *FSTL1* genotypu pro SMM. Analogické výsledky byly pozorovány v případě vytvoření zpětného krokového regresního modelu využívajícího jako závislou proměnnou pTBSMM a jako nezávislé proměnné pohlaví, věk, cal.GM a *FSTL1* genotyp.

Tabulka 7. Vybrané charakteristiky jedinců z kohorty OB v souvislosti s pohlavím a *FSTL1* genotypy

		Genotyp						
		Muži			Ženy			
	Dostupné hodnoty	TT	TG	GG	TT	TG	GG	Všechny skupiny
	n	n = 13	n = 20	n = 8	n = 35	n = 72	n = 35	n = 183
SMM	183	38,13 ± 4,87	41,46 ± 6,12	39,52 ± 5,35	28,42 ± 4,52	28 ± 4,29	26,5 ± 3,72	30,49 ± 6,89
pTBSMM	183	0,39 ± 0,05	0,39 ± 0,05	0,41 ± 0,05	0,34 ± 0,05	0,34 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,35 ± 0,05
Výška	183	175,14 ± 5,69	181,43 ± 6,11	180,81 ± 4,13	167,12 ± 5,67	165,61 ± 8,02	163,88 ± 5,97	168,64 ± 8,96
cal.AM	145	357,05 ± 172,58	397,54 ± 173,32	510,98 ± 190,36	277,66 ± 107,08	313,71 ± 165,88	348,02 ± 121,57	336,05 ± 158,06
cal.GM	145	319,59 ± 179,15	361,02 ± 157,45	484,71 ± 174,61	252,18 ± 103,3	285,73 ± 136,35	323,56 ± 114,63	307,47 ± 143,04

Legenda: SMM – Celkové množství hmoty kosterního svalu; pTBSMM – % celkového množství hmoty kosterního svalu; cal.AM – Aritmetický průměr energetického výdeje; cal.GM – Geometrický průměr energetického výdeje

Poznámka: v případě aritmetického (cal.AM) a geometrického (cal.GM) průměru energetického výdeje bylo testováno pouze 145 subjektů z celkových 183, z důvodu chybějících dat u 38 jedinců.

4.4 Asociace FSTL1 s výškou u kohorty OB

Stejně jako u analýz ostatních antropometrických znaků bylo nejprve provedeno testování výšky jedinců vzhledem k pohlaví. Podle očekávání byli muži významně vyšší než ženy (výška: muži vs ženy, 179,31 ± 6,23 vs 165,56 ± 7,07, $p < 0,001$). Následně byl testován vliv *FSTL1* genotypu na výšku u celé kohorty OB, kde však nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny (výška: TT vs TG vs GG, 169,29 ± 6,67 vs 169,05 ± 10,05 vs 167,03 ± 8,73, $p = 0,352$). Na druhou stranu, když byly hodnoceny jednotlivé genotypy pro každé pohlaví zvlášť, byl pozorován určitý trend u mužů, kde heterozygotní jedinci TG byli významně vyšší, než homozygotní jedinci TT (výška u mužů: TT vs TG, 175,14 ± 5,69 vs 181,43 ± 6,11, $p = 0,0098$) a homozygotní jedinci GG byli vyšší, než homozygotní jedinci TT, nicméně tato změna byla pozorována pouze na hraně statistické významnosti (výška u mužů: TT vs GG, 175,14 ± 5,69 vs 180,81 ± 4,13, $p = 0,0634$). U žen byla pozorována opačná lineární závislost *FSTL1* genotypu a výšky, tj. TT > TG > GG (výška u žen: TT vs TG vs GG, 167,12 ± 5,67 vs 165,61 ± 8,02 vs 163,88 ± 5,97), kde homozygoti TT byli významně vyšší než homozygoti GG (výška u žen: TT vs GG, 167,12 ± 5,67 vs 163,88 ± 5,97, $p = 0,0461$). Tento model, zahrnující *FSTL1* genotypy a pohlaví, vysvětluje 44,7 % variability ve výšce, kde 41,1 % je vysvětleno pohlavím, 0,5 % *FSTL1* genotypem a 3 % *FSTL1* genotypem v kombinaci s pohlavím (koeficient determinace = 0,4469).

Ve vícerozměrném regresním modelování, kde byla využita výška jako závislá proměnná a pohlaví, věk a *FSTL1* genotyp jako nezávislé proměnné, bylo po provedení zpětné krokové regresní analýzy potvrzeno, že všechny nezávislé proměnné, tj. pohlaví, věk a *FSTL1* genotyp, vykazovaly významnou prediktivní roli pro závislou proměnnou, kterou byla výška. Konkrétně bylo zjištěno, že *FSTL1* genotypy (TG a GG) jsou statisticky významné faktory na pohlaví-vázaného vyššího vzrůstu u mužů (výška u mužů: TG-TT vs GG-TT vs TG-GG, 4.9 cm ($p = 0,032$) vs 4,1 cm ($p = 0,161$) vs 0,8 cm ($p = 0,742$)), ale nikoliv u žen (výška u žen: TG-TT vs GG-TT vs TG-GG, 1,2 cm ($p = 0,341$) vs 2,3 cm ($p = 0,133$) vs 1,1 cm ($p = 0,422$)). Vzhledem k tomu, že rozdíly ve výšce mezi genotypy TG a GG byly minimální, byl vytvořen další model, který sloučil genotypy TG a GG. V tomto modelu, kde výška byla závislou proměnnou a pohlaví, věk a *FSTL1* genotyp byly nezávislé proměnné, věk a *FSTL1* genotypy TG+GG vykazovaly významnou prediktivní úlohu pro výšku u mužů (výška u mužů: (TG+GG)-TT, 4,7 cm ($p = 0,031$)), ale nikoliv u žen (výška u žen: TT-(TG+GG), 1,6 cm ($p = 0,200$)).

4.5 Asociace FSTL1 s fyzickou aktivitou u kohorty OB

V souvislosti s cal.AM a cal.GM bylo testováno pouze 145 subjektů z celkových 183, z důvodu chybějících dat u 38 jedinců. Když byly porovnány jednotlivé pohlaví s cal.AM a cal.GM, byly pozorovány statisticky významné změny mezi pohlavími v souvislosti jak s cal.AM (cal.AM: muži vs ženy, 404,98 ± 180,06 vs 313,28 ± 143,86, p = 0,003), tak i s cal.GM (cal.GM: muži vs ženy, 370,11 ± 174,55 vs 286,79 ± 125,16, p = 0,009). Když byly testovány jednotlivé genotypy, byla u cal.AM pozorována změna na hraně statistické významnosti (cal.AM: TT vs TG vs GG, 303,47 ± 135,01 vs 332,6 ± 170,03 vs 381,57 ± 150,69, p = 0,066), zatímco u cal.GM byla pozorována statisticky významná změna (cal.GM: TT vs TG vs GG, 274,09 ± 134,2 vs 302,69 ± 143,73 vs 356,74 ± 142,38, p = 0,028). Dále bylo zjištěno, že při analýze genotypů hodnocených zvlášť pro každé pohlaví, byla tato změna ještě významnější. Přímá lineární závislost *FSTL1* genotypů byla zjištěna u cal.AM jak u mužů (cal.AM u mužů: TT vs TG vs GG, 357,05 ± 172,58 vs 397,54 ± 173,32 vs 510,98 ± 190,36), tak u žen (cal.AM u žen: TT vs TG vs GG, 277,66 ± 107,08 vs 313,71 ± 165,88 vs 348,02 ± 121,57). Analogické výsledky byly zjištěny u cal.GM opět jak u mužů (cal.GM u mužů: TT vs TG vs GG, 319,59 ± 179,15 vs 361,02 ± 157,45 vs 484,71 ± 174,61), tak u žen (cal.GM u žen: TT vs TG vs GG, 252,18 ± 103,3 vs 285,73 ± 136,35 vs 323,56 ± 114,63). Tento model, zahrnující *FSTL1* genotypy a pohlaví, vysvětluje 12,1 % variability cal.AM, kde 6,9 % je vysvětleno pohlavím a 5,2 % *FSTL1* genotypem (koeficient determinace = 0,1215). V případě cal.GM tento model vysvětluje 11,5 % variability, kde 5,2 % je vysvětleno pohlavím a 6,2 % *FSTL1* genotypem (koeficient determinace = 0,1147).

4.6 Žádná asociace FSTL1 se studovanými znaky u kohorty SPO

U kohorty SPO bylo opět nejprve testováno množství SMM a pTBSMM. Nebylo však možné testovat rozdíl těchto dvou veličin mezi jednotlivými pohlavími, jelikož se v kohortě nacházeli pouze muži. Byla tedy nejprve testována má hypotéza, zda rozdílné *FSTL1* genotypy mají vliv na SMM a pTBSMM. Když byly testovány jednotlivé *FSTL1* genotypy, nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny u SMM (SMM: TT vs TG vs GG, 38,2 ± 2,2 vs 39,7 ± 2,2 vs 39,4 ± 5,7, p = 0,312) ani u pTBSMM (pTBSMM: TT vs TG vs GG, 0,51 ± 0,02 vs 0,52 ± 0,03 vs 0,52 ± 0,02, p = 0,928).

Následně byly analyzovány i zbylé zkoumané antropometrické znaky v souvislosti s genotypem. Nebyly však pozorovány žádné statisticky významné změny ani u výšky, u

které byl zjištěn vliv genotypu v případě kohorty OB, ani u ostatních znaků, tj. celkového množství tělesného tuku, celkového množství tělesné vody, váhy, BMI, procenta celkového množství tělesného tuku a procenta celkového množství tělesné vody (viz **Tabulku 6**).

5 DISKUSE

Je dobře známo, že fyzická aktivita má vliv na množství akutních i chronických změn v organismu, a to jak na úrovni SM, tak i kardiovaskulárního systému, včetně syntézy mitochondrií, remodelace svalových tkání, apoptózy či angiogeneze. Ačkoliv tyto změny mají mimo jiné také velký dopad na zdravotní stav jedince, molekulární mechanismy a regulace, které se na těchto změnách podílí, v současné době nejsou zcela pochopeny (Holloszy & Coyle, 1984; Egan & Zierath, 2013). Znalost takových molekulárních regulačních sítí podílejících se na adaptaci svalu a jeho správném fungování by mohla být klíčová v případě prevence a stanovení prognózy u nejrůznějších svalových onemocnění, ale také by mohla přispět k zmírnění dopadů těchto patologických odchylek a k jejich účinné léčbě.

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat vliv definované genetické variability v lokusu *FSTL1*, která se na těchto procesech může podílet, a analyzovat, jaké jsou možné asociace sekvenčních variant daného SNP s charakteristikami tělesného složení a fyzické aktivity. Tyto výsledky by mohly přispět k pochopení funkce genu v souvislosti se studovanými znaky, což by také mohlo mít pozitivní dopad na pochopení patofyziologických procesů svalové tkáně. Za tímto účelem byl vybrán právě gen *FSTL1*, u něhož sice byly popsány asociace se svalovou tkání, nicméně znalost jeho funkce v těchto procesech je v současné době minimální. Konkrétně byl analyzován G/T polymorfismus rs1057231, jehož alela G, na základě bioinformatických předpovědí, vede ke ztrátě vazebného místa pro miR-1, miR-206 a miR-613. miR-1 a miR-206 se mezi sebou na úrovni sekvence liší pouze minimálně a není proto překvapivé, že záměna jednoho nukleotidu v cílovém genu může vést k narušení vazby obou miRNA. Obě svalově-specifické miRNA, tj. miR-1 i miR-206, jsou v organismu silně exprimovány a ztráta jejich vazby na *FSTL1* mRNA může mít významný dopad na výsledný fenotyp, mimo jiné, právě v kontextu svalu, jelikož cílené geny těchto miRNA jsou často funkčně propojeny v jedné molekulární signální dráze. Naopak u miR-613 nebyla zatím publikována jakákoliv asociace se svalem, nicméně funkce této miRNA není v kontextu této diplomové práce velmi důležitá, jelikož ztráta vazebného místa pro miR-613, a s tím spojené potlačení jejího inhibičního účinku na *FSTL1*, může mít pozitivní dopad na výsledné množství FSTL1 proteinu bez ohledu ne její další funkce.

5.1 Žádná asociace FSTL1 s hmotou kosterního svalu u kohorty OB

Vývoj SM a procesy, podílející se na jeho údržbě a funkci, vyžadují přesnou genovou regulaci, které je dosaženo mimo jiné potlačením genové exprese pomocí miRNA molekul. Z tohoto důvodu bylo předpokládáno, že ztráta inhibice genu *FSTL1* by měla vést ke zvýšenému množství FSTL1 proteinu, což by se mohlo promítnout do změn v SMM a/nebo dalších antropometrických charakteristik studovaných subjektů. Po provedené genotypizaci byly zjištěné genotypy hodnoceny v souvislosti s SMM a pTBSMM, nicméně žádná významná změna nebyla pozorována ani u jednoho z testovaných znaků a to jak u mužů, tak u žen. Níže je uvedeno několik možných vysvětlení, proč změna hladiny FSTL1 proteinu nevedla k statisticky významným změnám v SM.

Na základě dříve zmíněné publikace, kde byla zjištěna korelace mezi hladinou FSTL1 a srdeční hypertrofií, byl v případě této diplomové práce předpokládán podobný účinek FSTL1 v SM (El-Armouche *et al.*, 2011). Bylo zjištěno, že *FSTL1* je významně méně exprimován v SM v porovnání se srdcem (Adams *et al.*, 2010). Je tedy možné, že ačkoliv je hladina proteinu FSTL1 v SM zvýšena, tato změna pořád nemusí být dostatečné velká k tomu, aby se to projevilo v hypertrofii SM. Navíc, srdeční sval se od SM značně liší a je možné, že FSTL1 se v případě těchto dvou tkání účastní odlišných signálních drah, které mohou být aktivní v srdci, ale umlčeny v SM, a naopak.

Účast *FSTL1* na růstu SM byla předpokládána také na základě homologie s *FST*, což je dobře popsaný agonista svalového růstu. FST je Aktivin-vázající protein obsahující tři FS domény, což jsou tři po sobě následující sekvence o délce přibližně 73–75 nukleotidů, z nichž každá obsahuje deset konzervovaných cysteinových zbytků (Sidis *et al.*, 2001; Keutmann *et al.*, 2004). Těmto FS doménám předchází N-terminální doména, obsahující hydrofobní zbytky, která je nezbytná pro vazbu Aktivinu a jeho neutralizaci. N-terminální doména samotná však není schopna vázat Aktivin či potlačit Aktivinem zprostředkovanou transkripci (Keutmann *et al.*, 2004). V případě FS domén bylo zjištěno, že delece domény 1 nebo 2 či mutace v jejich konzervovaných C-terminálních oblastech vedly k narušení vazby Aktivinu a biologické funkce FST. Vazba Aktivinu pomocí FST znemožňuje kontakt Aktivinu s buněčnými povrchovými receptory, což vede k narušení jeho bioaktivity (de Winter *et al.*, 1996). FST dále obsahuje epitopy pro vazbu Heparinu, které umožňují FST vázat heparan sulfát přítomný na povrchu buněk, což dále významně navyšuje aktivitu FST (Keutmann *et al.*, 2004). Jak bylo uvedeno výše, FSTL1 také obsahuje FS domény (Shibanuma *et al.*, 1993; Maurer *et al.*, 1995). Ačkoliv obsahuje FSTL1 na rozdíl od FST tyto domény pouze dvě, stále

je schopen vázat Aktivin s vysokou afinitou a nízkou reverzibilitou a tedy i inhibovat transkripci zprostředkovanou Aktivinem; nicméně jeho afinita k Aktivinu je významně nižší než v případě FST, převážně pro endogenní Aktivin, a schopnost inhibovat Aktivinem zprostředkovanou transkripci je asi 100x nižší než u FST (Tsuchida *et al.*, 2000; Sidis *et al.*, 2001, 2002; Schneyer *et al.*, 2001). Vazebná afinita pro proteiny rodiny TGFB je přibližně shodná jak pro FSTL1, tak pro FST, ale u obou je významně nižší, než vazebná afinita pro Aktivin (Tsuchida *et al.*, 2000; Sidis *et al.*, 2001; Schneyer *et al.*, 2001). S ohledem na strukturní rozdíly mezi těmito dvěma geny, FSTL1 neobsahuje Heparin-vázající doménu a signální peptid je štěpen v exonu 1, zatímco u FST je signální peptid štěpen na hranici exonu a intronu (Sidis *et al.*, 2002).

Ačkoliv byly *FSTL1* a *FST* detekovány téměř ve všech dospělých tkáních, místa s maximální expresí se převážně liší (Tsuchida *et al.*, 2000; Schneyer *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2010). Zatímco je *FSTL1* maximálně exprimován v placentě, nadledvinách, varlatech, srdci a slinivce, místa s maximální expresí *FST* jsou vaječníky, varlata, ledviny a játra. Expresní profil těchto dvou genů je odlišný také v průběhu vývoje (De Groot *et al.*, 2000). Je nutné však zmínit, že expresní profily *FSTL1* v dospělých tkáních nejsou zcela shodné mezi jednotlivými publikacemi. V závěru lze tedy říci, že ačkoliv má FSTL1 výraznou strukturní homologii s FST, stále jsou zde značné rozdíly na úrovni primární sekvence, vazebných domén a afinit, expresních profilů a bioaktivity, což může naznačovat jejich rozdílné biologické funkce v určitých tkáních.

V neposlední řadě je také nutné zmínit, že v průběhu vypracovávání diplomové práce byla aktualizována databáze, která byla využita pro návrh tohoto experimentu, tj. miRNASNP (www.bioguo.org/miRNASNP; v2, říjen 2014) (Gong *et al.*, 2012). Podle nově aktualizované verze této databáze, alela G studovaného polymorfismu rs1057231 stále vede ke ztrátě vazebného místa pro miR-206 a miR-613, ale ne pro miR-1. Tato nová skutečnost může mít za následek to, že nedojde k tak velkému nárůstu hladiny proteinu FSTL1, jak bylo původně předpokládáno. Na druhou stranu, kromě miR-206 a miR-613, je u alely G nově předpokládána ztráta vazebného místa pro miR-33a-3p, ačkoliv podle aktualizované databáze jsou miR-33a-3p a miR-613 průměrně exprimovány výrazně méně než miR-206 (a miR-1) a k regulaci *FSTL1* tedy přispívají významně méně. Navíc je nově předpokládáno, že alela G způsobuje vznik vazebného místa pro miR-4747-5p a miR-5196-5p, což ve výsledku může znamenat, že očekávané zvýšení hladiny proteinu způsobené ztrátou vazebného místa pro miR-206 (a možná pro miR-1) může být dále sníženo oproti původním předpokladům. Je však třeba podotknout, že miR-4747-5p a miR-5196-5p nejsou velmi významně exprimovány a

proto jejich negativní regulace *FSTL1* nemusí způsobit velkou změnu v hladině proteinu. Obdobně jako v případě miR-613, nebyla doposud publikována žádná asociace mezi miR-33a, miR-4747 nebo miR-5196 a SM.

5.2 Rozdílná asociace FSTL1 s výškou mezi muži a ženami u kohorty OB

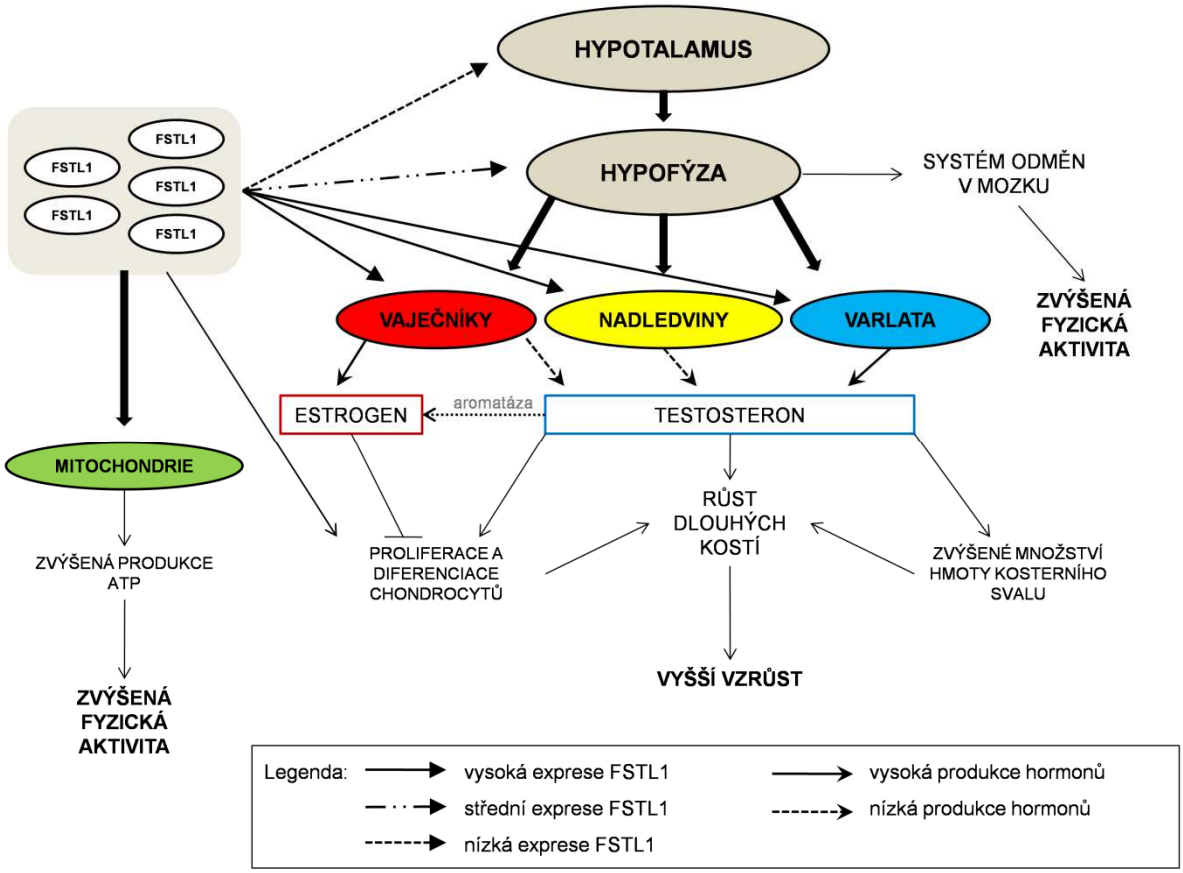
Ačkoliv nebyly zjištěny významné rozdíly u SMM a pTBSMM, byl pozorován statisticky významný rozdíl ve výšce v souvislosti s *FSTL1* genotypem a pohlavím. Konkrétně byla pozorována lineární korelace mezi výškou u žen a genotypem (TT > TG > GG). Jelikož byla očekávána vyšší hladina proteinu v přítomnosti alely G, tyto výsledky naznačují negativní korelaci mezi výškou u žen a hladinou FSTL1. Podobné výsledky, tj. inverzní korelace hladiny FSTL1 v séru s výškou u žen, byly publikovány ve studii zabývající se hladinou FSTL1 v séru v souvislosti s osteoartritidou u Čínské populace (Wang *et al.*, 2011). Na druhou stranu byla zjištěna protichůdná, statisticky významná změna u mužů v souvislosti s genotypem. V tomto případě byli nosiči alely G významně vyšší oproti homozygotům TT, tj. TG > GG > TT, s minimálními rozdíly mezi genotypy TG a GG. Z těchto výsledků vyplývá, že vyšší vzrůst je u mužů vázán na alelu G, tedy že vyšší hladina FSTL1 je asociována s vyšším vzrůstem u mužů, zatímco u žen byl pozorován opačný efekt. Bylo navrženo několik možných vysvětlení pro tyto protichůdné výsledky u výšky mezi muži a ženami v souvislosti s hladinou FSTL1.

Nejprve byly porovnány zjištěné hladiny FSTL1 mezi pohlavími. Podle očekávání bylo rozdělení FSLT1 heterogenní, s celkově vyššími hladinami FSTL1 u žen (Wang *et al.*, 2011). Tyto rozdílné exprese však nevysvětlují protichůdné výsledky u výšky mezi muži a ženami. Z tohoto důvodu byla navržena hypotéza, že tyto výsledky by mohly být způsobeny pohlavními rozdíly, konkrétně, že by mohl mít FSTL1 vliv na pohlavní hormony. Jak bylo uvedeno výše, tkáně s maximální expresí *FSTL1* jsou mimo jiné nadledviny a varlata, tedy tkáně zodpovědné za tvorbu a sekreci pohlavních hormonů (Tsuchida *et al.*, 2000). Je známo, že vnitřní kůra nadledvin u lidí, *zona reticularis*, produkuje a sekretuje androgeny – dihydroepiandrosteron, dihydroepiandrosteron-sulfát a androstendion, což je prekurzor testosteronu. Naprostá většina testosteronu je však produkována varlaty u mužů, konkrétně Leydigovými buňkami, což jsou endokrinní elementy varlat, kde je významně exprimován *FSTL1* (Uhlén *et al.*, 2015). Androgeny obecně stimulují proteosyntézu a růst tkání s odpovídajícími receptory. Konkrétně testosteron má několik důležitých biologických funkcí zahrnujících růst těla, svalů a dlouhých kostí, což může mít přímý nebo nepřímý vliv na

výšku (Kung, 2003). V případě testosteronu však také bylo zjištěno, že funguje jako pro-hormon, jelikož může být pomocí enzymu aromatázy aromatizován na estrogen (Kung, 2003; Khosla, 2015). Na základě mých výsledků, vysoké exprese *FSTL1* v nadledvinách a Leidygových buňkách ve varlatech a známé stimulační funkce testosteronu na růst byla stanovena hypotéza, že FSTL1 může mít pozitivní vliv na produkci a/nebo sekreci testosteronu a dalších androgenů v nadledvinách a varlatech (viz **Obrázek 8**). Na druhou stranu je však *FSTL1* exprimován také ve vaječnících, kde je však jeho exprese přibližně poloviční oproti varlatům (Tsuchida *et al.*, 2000). Vaječníky produkují ženské pohlavní hormony, estrogen a progesteron, ale také testosteron, který je zde tvořen přibližně ve stejném množství jako v nadledvinách. Celková produkce testosteronu je však u žen významně nižší než u mužů. Dále bylo zjištěno, že exprese *FSTL1* je stimulována právě ženským pohlavním hormonem estrogenem (Ohashi *et al.*, 1997). Co je důležité, známé biologické funkce estrogenu zahrnují urychlení růstu a fúzi epifyzárních plotének a zastavení růstu dlouhých kostí, což by následně mohlo způsobit celkové zastavení růstu a tedy výsledný nižší vzrůst (Emons *et al.*, 2011; Shim, 2015). Z výše uvedeného vyplývá, že zvýšená hladina FSTL1 by mohla mít pozitivní vliv na hormonální stimulaci ve vaječnících u žen, obdobně jako ve varlatech u mužů nebo v nadledvinách, což by mohlo spolehlivě vysvětlit protichůdný efekt zvýšené hladiny FSTL1 na výšku u mužů a u žen.

V průběhu vývoje je *FSTL1* převážně exprimován v mezenchymálních tkáních (Sylva *et al.*, 2011, 2013). Kromě potenciální FSTL1-zprostředkované hormonální stimulace, která může mít pozitivní či inhibiční vliv na růst kostí, bylo také zjištěno, že se FSTL1 významně podílí na vývoji kostí. U FSTL1 knock-out experimentů byly pozorovány defekty v enchondrálním vývoji kostí, neonatální letalita, abnormální poloha hlavy, defekty končetin a axiálního skeletu, ohýbání dlouhých kostí a defekty připojení žeber ke sternu (Sylva *et al.*, 2011, 2013; Chaly *et al.*, 2014*a*). Nedávná studie potvrdila, že FSTL1 hraje klíčovou roli také ve vývoji chrupavky (Chaly *et al.*, 2014*a*). Autoři pozorovali snížené množství buněk chrupavky a narušenou proliferační schopnost u FSTL1-deficientních chondrocytů a také sníženou schopnost buněčného dělení u prekurzorových buněk chondrocytů, tj. mezenchymálních kmenových buněk. V této studii bylo následně prokázáno, že FSTL1 pozitivně reguluje diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk do chondrocytů. FSTL1 je tedy zodpovědný za správný vývoj kostí a chrupavek, což by mohlo mít nepřímý vliv na vyšší vzrůst, nicméně to nevysvětluje rozdíly ve výšce mezi muži a ženami. Co by tedy vysvětlovalo rozdílné výsledky mezi muži a ženami je skutečnost, že růst epifyzárních

plotének je řízen hormonálním systémem. Tento růst je stimulován růstovým hormonem, sekretovaným hypofýzou, a testosteronem, zatímco estrogeny mají účinky opačné.



Obrázek 8. Možný vliv FSTL1 na endokrinní systém. Obrázek znázorňuje schéma exprese FSTL1 a jeho potenciální účast v regulaci endokrinního systému a mitochondriálního energetického metabolismu. Podrobnější vysvětlení je uvedeno v textu.

5.3 Asociace alely G s vyšší fyzickou aktivitou u kohorty OB

Kromě výšky byly pozorovány statisticky významné změny v závislosti na genotypu také u cal.AM a cal.GM. Výsledky této diplomové práce naznačují, že nosiči alely G (tj. GG > TG > TT) vykazovali vyšší energetický výdej, který byl odhadnut na základě měření aerobních kroků pomocí pedometru. Nicméně je potřeba zdůraznit, že tyto údaje nebyly upraveny na bazální metabolismus a kroky samotné neodrážejí celkový energetický výdej, z těchto důvodů je interpretace komplikovaná a tyto výsledky by měly být brány velmi obezřetně. Na základě těchto výsledků byla poskytnuta dvě možná vysvětlení.

Mnoho studií poskytlo přesvědčivé důkazy o tom, že pravidelná fyzická aktivita poskytuje fyzické i psychické výhody, a byla asociována se zlepšenou náladou a celkovou

emociální pohodou (Sher, 1998). Tedy, na základě předchozí hypotézy, že FSTL1 indukuje hormonální stimulaci, bylo předpokládáno možné spojení mezi fyzickou aktivitou a systémem odměn v mozku (viz **Obrázek 8**). Tento systém funguje na základě stimulu, který mění chování jedince. Tento stimul způsobuje zvýšení pravděpodobnosti výskytu chování, které je spojeno s tímto stimulem. Hlavní struktury systému odměn se nachází v limbickém systému a zahrnují mimo jiné hypotalamus. Hypotalamus je nedílnou součástí tohoto systému a je přímo zahrnut v modulaci endokrinní dráhy systému odměn, která je řízena přes hypotalamo–hypofyzární osu. Bylo zjištěno, že u myší je *FSTL1* během vývoje centrální nervové soustavy exprimován v limbickém systému, nicméně tato data nebyla zkoumána u lidí (Yang *et al.*, 2009). Na základě expresních profilů v dospělých tkáních bylo zjištěno, že *FSTL1* je v hypotalamu exprimován pouze slabě (Wu *et al.*, 2013). Naopak byla pozorována silná exprese *FSTL1* v hypofýze, kde byla také zjištěna nejvyšší exprese FSTL1 buněčného receptoru DIP2A (DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A), který zprostředkovává buněčné funkce FSTL1 (Tsuchida *et al.*, 2000; Ouchi *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2010). Bylo popsáno, že DIP2A fyzicky interaguje s FSTL1 a knock-out experimenty tohoto receptoru vedly k omezení schopnosti FSTL1 vázat se na buňky (Ouchi *et al.*, 2010). Ačkoliv tedy není exprese *FSTL1* v hypofýze tak výrazná jako ve varlatech nebo nadledvinách, tato nižší exprese by mohla být kompenzována vysokou expresí buněčného receptoru DIP2A, což by mohlo následně navýšit buněčné efektorové funkce FSTL1. Kromě receptoru DIP2A, FSTL1 také interaguje s CD14 a s členy TGFB suprrodiny a jejich receptory, což může odrážet široké spektrum fyziologických funkcí proteinu FSTL1 (Tanaka *et al.*, 2010). Vzhledem k chybějícím publikacím popisujícím funkci FSTL1 v hypofýze bylo prozkoumáno, zda je v hypofýze exprimován homolog *FST* a zda se nějak podílí na její regulaci. Na základě analýzy exprese *FST* bylo zjištěno, že je exprimován v hypofýze, ačkoliv tato exprese je významně nižší, než v případě *FSTL1* (Wu *et al.*, 2013). Navíc bylo zjištěno, že v krysí hypofýze FST zprostředkovává vazbu Aktivinu na buněčný povrch, což vede k lyzozomální degradaci Aktivinu (Hashimoto *et al.*, 1997). Autoři také pozorovali, že degradace Aktivinu byla narušena heparan sulfátem, nicméně v případě navázání FST na heparan sulfát nacházející se na povrchu buněk byla degradace Aktivinu významně urychlena. Rozdílná exprese a nepřítomnost Heparin-vázající domény u FSTL1 naznačuje jeho rozdílnou fyziologickou roli v hypofýze. Naopak bylo pozorováno, že přidání FSTL1 vedlo k rapidní aktivaci intracelulárních signálních molekul, což podporuje hypotézu, že FSTL1 nepůsobí na buňky nepřímo díky inhibici proteinů TGFB rodiny, ale spíše přímým působením a vazbou na povrchové receptory (Oshima *et al.*, 2008; Ouchi *et al.*, 2008, 2010). V závěru lze tedy

předpokládat, na základě exprese *FSTL1* v hypotalamu a silnější exprese v hypofýze, kde je vysoce exprimován také jeho buněčný receptor *DIP2A*, a jeho odlišné funkce od Aktivin-degradujícího *FST*, že zvýšená hladina FSTL1 proteinu v hypotalamu a hypofýze může mít stimulační efekt na systém odměn v mozku řízený přes hypotalamo–hypofyzární osu, což se mohlo výsledně projevit ve zvýšené fyzické aktivitě studovaných subjektů.

Další možné vysvětlení pozorované asociace týkající se vyšší fyzické aktivity v souvislosti se zvýšenou hladinou FSTL1 může být dáno jeho spojitostí s respiračním řetězcem v mitochondriích. Bylo zjištěno, že protein FSTL1 se může dostat do buňky, kde je schopen se za určitých podmínek vázat na mitochondrie, čímž pozitivně stimuluje produkci ATP (Chaly *et al.*, 2013). Následně byly touto skupinou pozorovány a popsány obdobné výsledky týkající se asociace FSTL1 s aktivací mitochondriálního elektronového transportního řetězce (Chaly *et al.*, 2014*b*). Bylo popsáno, že v případě inhibice *FSTL1* pomocí krátkých RNA došlo k významnému poklesu aktivity komplexů elektronových transportních řetězců I a III a naopak, transfekce buněk, které za normálních podmínek neexprimují FSTL1, exogenní *FSTL1* cDNA nebo FSTL1 proteinem vedla k navýšení produkce ATP. Na základě těchto pozorování autoři přepokládali úlohu FSTL1 v buněčném energetickém metabolismu. Z výše uvedeného byl formulován závěr, že zvýšená FSTL1 exprese může pozitivním způsobem indukovat energetický metabolismus v mitochondriích aktivací elektronového transportního řetězce, což mohlo následně nepřímo vést k navýšení fyzické aktivity u studovaných subjektů.

5.4 Žádná asociace FSTL1 se studovanými znaky u kohorty SPO

Ačkoliv v případě kohorty SPO nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny v souvislosti s *FSTL1* genotypem, při důkladnějším prozkoumání analyzovaných dat (viz **Tabulku 6**) bylo zjištěno, že nosiči alely G (tj. TG a GG) mají větší množství SMM, než homozygoti TT. Obdobné výsledky jako v případě kohorty OB byly pozorovány v případě výšky u mužů, nosiči alely G (tj. TG a GG) byli vyšší než homozygoti TT a mezi jedinci TG a GG byl pouze nepatrný rozdíl ve výšce. V tomto případě však chybí data o výšce u žen v tréninku, která by mohla být porovnána s daty o výšce žen z kohorty OB. Ačkoliv tyto výsledky nebyly statisticky významné, dále v textu jsou poskytnuty možná vysvětlení pro tato pozorování.

Bylo zjištěno, že cvičení velmi výrazně navyšuje množství FSTL1 v plazmě (Görgens *et al.*, 2013). Jak bylo uvedeno výše, možná příčina toho, že nebyly pozorovány žádné změny

v SMM u kohorty OB, je taková, že *FSTL1* není v SM exprimován velmi významně a ani alela G, zajišťující zvýšené množství proteinu FSTL1, nemusí způsobit dostatečně velkou změnu v hladině proteinu na to, aby se to projevilo na hypertrofii SM. Naopak u kohorty SPO data naznačují, že vyšší množství SMM je vázáno na alelu G. Výsledná pozitivní změna hladiny proteinu FSTL1 vyvolána přítomností alely G by mohla být následně významně navýšena tím, že jedinci kohorty SPO pravidelně trénovali. To by ve výsledku mohlo zajistit dostatečně vysoké množství proteinu FSTL1, které by se mohlo projevit na hypertrofii SM.

Ačkoliv tyto výsledky nejsou statisticky významné, je pravděpodobné, že je to dáno pouze malým vzorkem studovaných subjektů (31), a je tedy potřeba tyto výsledky ověřit na větší kohortě sportujících jedinců. V neposlední řadě, antropometrické charakteristiky analyzované u kohorty SPO byly naměřeny před zahájením dlouhodobého tréninku a bylo by tedy vhodné provést stejnou analýzu s využitím dat naměřených po skončení tohoto tréninku, kde by pozorované změny v případě SMM mohly být výraznější, díky zvýšenému množství FSTL1, které by bylo indukováno intenzivním tréninkem.

Nakonec byly porovnány alelové četnosti mezi kohortami OB a SPO, které by mohly naznačit, zda alela G nepredisponuje jedince ke sportu. Četnost alely G byla u kohorty OB 0,49, zatímco u kohorty SPO 0,56. Zjištěné hodnoty tedy nenaznačují, že by alela G predisponovala jedince ke sportu.

5.5 Limitace diplomové práce

Tato diplomová práce se potýká s určitými omezeními. Hlavní limitace vychází z charakteru retrospektivní studie v případě kohorty OB, kdy nebyl dostatek klinického materiálu pro stanovení hladiny proteinu FSTL1. V případě kohorty SPO bylo množství materiálu dostačující, nicméně vzhledem k statisticky malému vzorku jedinců měření hladiny FSTL1 provedeno nebylo, jelikož by nemělo dostačující vypovídající hodnotu. Z těchto důvodů, závěry učiněné v této diplomové práci jsou založeny pouze na bioinformatických předpovědích, tj. že ztráta vazebného místa pro miRNA v 3‘ UTR genu *FSTL1* je zodpovědná za zvýšené množství proteinu. Další omezení se týká vydání aktualizované verze databáze, využité pro návrh tohoto experimentu, v průběhu vypracovávání této diplomové práce, u které byly zjištěny mírně odlišné bioinformatické výstupy. Výsledky mohou být také částečně zkresleny díky statisticky menšímu zastoupení počtu mužů v případě kohorty OB a celkově nižšímu počtu jedinců v případě kohorty SPO. Samotné porovnání kohort je také obtížné,

jelikož antropometrická data byla měřena odlišnými přístroji. V neposlední řadě, energetický výdej odhadnut na základě dat z pedometru u kohorty OB nereprezentuje celkový energetický výdej jedince a tato data také nebyla upravena na bazální metabolismus jedinců.

6 SHRNUTÍ

Vliv genetické variability v genu pro FSTL1 na tělesné složení u atletů v tréninku i u běžné obézní i neobézní české populace.

V této diplomové práci byl zkoumán SNP (rs1057231) nacházející se ve vazebném místě pro miRNA v 3‘ UTR genu *FSTL1*. Alela G tohoto polymorfismu by měla vést ke zvýšenému množství FSTL1 proteinu.

Nicméně navzdory mé původní hypotéze, založené na podobnosti *FSTL1* s *FST*, nebyla pozorována žádna souvislost *FSTL1* genotypu s SMM a/nebo s pTBSMM. Byly učiněny závěry, shrnující nepozorovanou asociaci mezi FSTL1 a SMM a/nebo pTBSMM: (1) FSTL1 je strukturní, ale ne nutně funkční homolog FST, (2) exprese *FSTL1* se liší od exprese *FST* jak v dospělých tkáních, tak v průběhu vývoje, a/nebo (3) ztráta vazby miRNA způsobená alelou G nemusí být dostatečná k tomu, aby vedla k takové změně hladiny FSTL1, která by měla podstatný vliv na SMM.

Na druhou stranu se v této diplomové práci objevily nové, statisticky významné efekty variant *FSTL1* na tělesnou výšku a celkový denní počet aerobních kroků u kohorty OB. Na základě pozorovaných výsledků a expresních profilů *FSTL1* byla stanovena hypotéza, že zvýšena hladina FSTL1 může mít pozitivní vliv na hormonální stimulaci. Tato hypotéza by vysvětlovala opačný efekt hladiny FSTL1 na výšku mezi muži a ženami díky rozdílům v účincích pohlavních hormonů, jelikož bylo prokázáno, že FSTL1 stimuluje růst chrupavek dlouhých kostí, což je dále stimulováno testosteronem, ale inhibováno estrogenem.

Pozorovaná asociace se zvýšenou fyzickou aktivitou by mohla být vysvětlena pozitivním účinkem FSTL1 na hormonální stimulaci, konkrétně v hypotalamo–hypofyzární soustavě zapojené do systému odměn v mozku, a/nebo na produkci ATP v mitochondriích.

V případě kohorty SPO nebyly pozorovány žádné statistky významné změny v souvislosti s genotypem, což však bylo pravděpodobně způsobeno statisticky malým počtem jedinců této kohorty.

Závěrem lze říci, že *FSTL1* se může významným podílem účastnit genetického programování tělesné výšky, a to zejména u mužů, přičemž je pravděpodobné, že je zapojen i do přímých hormonálních regulací zahrnujících pohlavní hormony. Jeho role v tomto procesu zaslouží další podrobné zkoumání.

7 SUMMARY

The influence of genetic variation in the FSTL1 gene on body composition in training athletes and general obese and non-obese Czech population.

In summary, SNP (rs1057231) in the miRNA binding site within the *FSTL1* 3‘ UTR, which should result in elevated FSTL1 protein level, was investigated.

However, no association of the *FSTL1* genotype with SMM or with pTBSMM was observed, as it was originally hypothesized based on described FSTL1 homology with FST. It was concluded that these results may be due to several reasons: (1) FSTL1 is a structural but not functional homolog of FST, (2) the expression of *FSTL1* differs from the expression of *FST* in adult tissues and in the course of development, and/or (3) the change in miRNA binding site caused by the G allele of studied SNP may not be sufficient enough to cause a change in the FSTL1 protein level that would result in significant change in SMM.

On the other hand, novel statistically significant effects of *FSTL1* variants on height and total daily number of steps were observed in the OB cohort. Based primarily on expression profiles of FSTL1 and on my results, it was hypothesized that an enhanced FSTL1 level may have a positive impact on hormone stimulation, which apparently has an opposite effect on height in males and females due to sex-related hormonal differences. Moreover, FSTL1 was shown to be involved in cartilage growth, which may be further stimulated or suppressed by testosterone or estrogen, respectively.

Finally, an association of the G allele with an increase in physical activity (cal.AM and cal.GM) was observed, which may be explained by the increased FSTL1 hormonal stimulation of the hypothalamic–pituitary system connected with the reward system of the brain and/or by FSTL1 involvement in mitochondrial energy production.

Nevertheless, no changes were observed in the SPO cohort in the context of the *FSTL1* genotype, which was probably due to a low number of study individuals.

In summary, *FSTL1* may be a significant contributor of genetic programming of body height, specifically in males. It is probable that *FSTL1* is directly involved in hormonal regulation pathways including sex hormones. Its role in this process deserves further investigation.

8 PŘEHLED LITERATURY

Adams DC, Karolak MJ, Larman BW, Liaw L, Nolin JD & Oxburgh L (2010). Follistatin-like 1 regulates renal IL-1β expression in cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* **299,** F1320–F1327.

Adams D, Larman B & Oxburgh L (2007). Developmental expression of mouse Follistatin-like 1 (Fstl1): Dynamic regulation during organogenesis of the kidney and lung. *Gene Expr Patterns GEP* **7,** 491–500.

Aoki H, Fujii M, Imamura T, Yagi K, Takehara K, Kato M & Miyazono K (2001). Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci* **114,** 1483–1489.

Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell* **116,** 281–297.

Behm-Ansmant I (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* **20,** 1885–1898.

Berezikov E, Chung W-J, Willis J, Cuppen E & Lai EC (2007). Mammalian Mirtron Genes. *Mol Cell* **28,** 328–336.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM & Hannon GJ (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409,** 363–366.

Borchert GM, Lanier W & Davidson BL (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct 38 Mol Biol* **13,** 1097–1101.

Brand-Saberi B (2005). Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. *Ann Anat - Anat Anz* **187,** 199–207.

Brennecke J, Stark A, Russell RB & Cohen SM (2005). Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biol* **3,** e85.

Cai X (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10,** 1957–1966.

Chaly Y, Blair HC, Smith SM, Bushnell DS, Marinov AD, Campfield BT & Hirsch R (2014*a*). Follistatin-like protein 1 regulates chondrocyte proliferation and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Ann Rheum Dis*; DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204822.

Chaly Y, Fu Y, Marinov A, Hostager B, Yan W, Campfield B, Kellum JA, Bushnell D, Wang Y, Vockley J & Hirsch R (2014*b*). Follistatin-like protein 1 enhances NLRP3 inflammasome-mediated IL-1β secretion from monocytes and macrophages. *Eur J Immunol* **44,** 1467–1479.

Chaly Y, Marinov A, Fu Y, Campfield B, Kellum J & Hostager B (2013). A Novel Pro-Inflammatory Signaling Pathway Regulated By Follistatin-Like Protein 1 (Abstract). *Arthritis Rheum* **65,** 1169.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K & Shiekhattar R (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436,** 740–744.

Chen J-F, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL & Wang D-Z (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* **38,** 228–233.

Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, Ma E, Mane S, Hannon GJ, Lawson ND, Wolfe SA & Giraldez AJ (2010). A Novel miRNA Processing Pathway Independent of Dicer Requires Argonaute2 Catalytic Activity. *Science* **328,** 1694–1698.

Davis BN, Hilyard AC, Lagna G & Hata A (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* **454,** 56–61.

Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G & Hata A (2010). Smad Proteins Bind a Conserved RNA Sequence to Promote MicroRNA Maturation by Drosha. *Mol Cell* **39,** 373–384.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF & Hannon GJ (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432,** 231–235.

Egan B & Zierath JR (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* **17,** 162–184.

El-Armouche A, Ouchi N, Tanaka K, Doros G, Wittköpper K, Schulze T, Eschenhagen T, Walsh K & Sam F (2011). Follistatin-like 1 in chronic systolic heart failure: a marker of left ventricular remodeling. *Circ Heart Fail* **4,** 621–627.

Emons J, Chagin AS, Sävendahl L, Karperien M & Wit JM (2011). Mechanisms of growth plate maturation and epiphyseal fusion. *Horm Res Pædiatrics* **75,** 383–391.

Forman JJ, Legesse-Miller A & Coller HA (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci* **105,** 14879–14884.

Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB & Bartel DP (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19,** 92–105.

Furutani Y, Umemoto T, Murakami M, Matsui T & Funaba M (2011). Role of endogenous TGF-β family in myogenic differentiation of C2C12 cells. *J Cell Biochem* **112,** 614–624.

Geng Y, Dong Y, Yu M, Zhang L, Yan X, Sun J, Qiao L, Geng H, Nakajima M, Furuichi T, Ikegawa S, Gao X, Chen Y-G, Jiang D & Ning W (2011). Follistatin-like 1 (Fstl1) is a bone morphogenetic protein (BMP) 4 signaling antagonist in controlling mouse lung development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108,** 7058–7063.

Georges M, Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Hiard S, Tordoir X, Caiment F, Meish F, Bibé B, Bouix J, Elsen JM, Eychenne F, Laville E, Larzul C, Milenkovic D, Tobin J & Charlier AC (2006). Polymorphic microRNA-target interactions: a novel source of phenotypic variation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71,** 343–350.

Gong J, Tong Y, Zhang H-M, Wang K, Hu T, Shan G, Sun J & Guo A-Y (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum Mutat* **33,** 254–263.

Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S & Bhasin S (1998). Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95,** 14938–14943.

Görgens SW, Raschke S, Holven KB, Jensen J, Eckardt K & Eckel J (2013). Regulation of follistatin-like protein 1 expression and secretion in primary human skeletal muscle cells. *Arch Physiol Biochem* **119,** 75–80.

Gregory RI, Yan K, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N & Shiekhattar R (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432,** 235–240.

Griffiths-Jones S (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* **32,** 109D – 111.

Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G & Mello CC (2001). Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control< i> C. elegans</i> Developmental Timing. *Cell* **106,** 23–34.

De Groot E, Feijen A, Eib D, Zwijsen A, Sugino H, Martens G & Van Den Eijnden-Van Raaij AJ (2000). Expression patterns of follistatin and two follistatin-related proteins during mouse development. *Int J Dev Biol* **44,** 327–330.

Hambrock HO, Kaufmann B, Müller S, Hanisch F-G, Nose K, Paulsson M, Maurer P & Hartmann U (2004). Structural characterization of TSC-36/Flik: analysis of two charge isoforms. *J Biol Chem* **279,** 11727–11735.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D & Hannon GJ (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *nature* **404,** 293–296.

Hashimoto O, Nakamura T, Shoji H, Shimasaki S, Hayashi Y & Sugino H (1997). A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. *J Biol Chem* **272,** 13835–13842.

Holloszy JO & Coyle EF (1984). Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* **56,** 831–838.

Hutvagner G (2001). A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science* **293,** 834–838.

Ito Y, Kayama T & Asahara H (2012). A Systems Approach and Skeletal Myogenesis. *Comp Funct Genomics* **2012,** 1–7.

Jopling CL (2005). Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science* **309,** 1577–1581.

Jørgensen LH, Petersson SJ, Sellathurai J, Andersen DC, Thayssen S, Sant DJ, Jensen CH & Schrøder HD (2009). Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in human skeletal muscle. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* **57,** 29–39.

Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A & Suda T (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* **127,** 1755–1766.

Keutmann HT, Schneyer AL & Sidis Y (2004). The role of follistatin domains in follistatin biological action. *Mol Endocrinol Baltim Md* **18,** 228–240.

Khosla S (2015). Commentary: New Insights Into Androgen and Estrogen Receptor Regulation of the Male Skeleton. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*; DOI: 10.1002/jbmr.2529.

Khvorova A, Reynolds A & Jayasena SD (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115,** 209–216.

Kingsley DM (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* **8,** 133–146.

Kirby TJ, Chaillou T & McCarthy JJ (2015). The role of microRNAs in skeletal muscle health and disease. *Front Biosci Landmark Ed* **20,** 37–77.

Knight JD & Kothary R (2011). The myogenic kinome: protein kinases critical to mammalian skeletal myogenesis. *Skelet Muscle* **1,** 29.

Kung AWC (2003). Androgen and bone mass in men. *Asian J Androl* **5,** 148–154.

Lagos-Quintana M (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* **294,** 853–858.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A & Tuschl T (2003). New microRNAs from mouse and human. *Rna* **9,** 175–179.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W & Tuschl T (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12,** 735–739.

Lau NC (2001). An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in Caenorhabditis elegans. *Science* **294,** 858–862.

Lee RC & Ambros (2001). An Extensive Class of Small RNAs in Caenorhabditis elegans. *Science* **294,** 862–864.

Lee RC, Feinbaum RL & Ambros V (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75,** 843–854.

Lee SJ & McPherron AC (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98,** 9306–9311.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, R\aadmark O & Kim S (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425,** 415–419.

Lee Y, Hur I, Park S-Y, Kim Y-K, Suh MR & Kim VN (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* **25,** 522–532.

Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S & Kim VN (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* **21,** 4663–4670.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH & Kim VN (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23,** 4051–4060.

Lehnert SA, Reverter A, Byrne KA, Wang Y, Nattrass GS, Hudson NJ & Greenwood PL (2007). Gene expression studies of developing bovine longissimus muscle from two different beef cattle breeds. *BMC Dev Biol* **7,** 95.

Liu J (2004). Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science* **305,** 1437–1441.

Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, Parker R & Hannon GJ (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* **7,** 1261–1266.

Liu N, Williams AH, Kim Y, McAnally J, Bezprozvannaya S, Sutherland LB, Richardson JA, Bassel-Duby R & Olson EN (2007). An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci* **104,** 20844–20849.

Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R & Tuschl T (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110,** 563–574.

Massari ME & Murre C (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20,** 429–440.

Maurer P, Hohenadl C, Hohenester E, Göhring W, Timpl R & Engel J (1995). The C-terminal portion of BM-40 (SPARC/osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domain that binds calcium and collagen IV. *J Mol Biol* **253,** 347–357.

Ma Y, Bertone ER, Stanek EJ, Reed GW, Hebert JR, Cohen NL, Merriam PA & Ockene IS (2003). Association between eating patterns and obesity in a free-living US adult population. *Am J Epidemiol* **158,** 85–92.

Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G & Tuschl T (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **15,** 185–197.

Miyamae T, Marinov AD, Sowders D, Wilson DC, Devlin J, Boudreau R, Robbins P & Hirsch R (2006). Follistatin-like protein-1 is a novel proinflammatory molecule. *J Immunol Baltim Md 1950* **177,** 4758–4762.

Nohata N, Hanazawa T, Enokida H & Seki N (2012). microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget* **3,** 9.

Nojima J, Kanomata K, Takada Y, Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Takada T, Tsukui T, Yamamoto TS, Sasanuma H, Yoneyama K, Ueno N, Okazaki Y, Kamijo R, Yoda T &

Katagiri T (2010). Dual roles of smad proteins in the conversion from myoblasts to osteoblastic cells by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* **285,** 15577–15586.

Ohashi T, Sato S, Yoshiki A & Kusakabe M (1997). TSC-36 (follistatin-related polypeptide) gene expression in estrogen receptor positive osteoblastic cell line, CDO7F. *Calcif Tissue Int* **61,** 400–403.

Ørom UA, Nielsen FC & Lund AH (2008). MicroRNA-10a Binds the 5′UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Mol Cell* **30,** 460–471.

Oshima Y, Ouchi N, Sato K, Izumiya Y, Pimentel DR & Walsh K (2008). Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart. *Circulation* **117,** 3099–3108.

Ouchi N, Asaumi Y, Ohashi K, Higuchi A, Sono-Romanelli S, Oshima Y & Walsh K (2010). DIP2A functions as a FSTL1 receptor. *J Biol Chem* **285,** 7127–7134.

Ouchi N, Oshima Y, Ohashi K, Higuchi A, Ikegami C, Izumiya Y & Walsh K (2008). Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *J Biol Chem* **283,** 32802–32811.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B & Müller P (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408,** 86–89.

Perry RL & Rudnick MA (2000). Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci J Virtual Libr* **5,** D750–D767.

Pillai RS (2005). Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science* **309,** 1573–1576.

Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S & Lodish HF (2006). Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci* **103,** 8721–8726.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR & Ruvkun G (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Nature* **403,** 901–906.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL & Bradley A (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14,** 1902–1910.

Van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Kelm Jr. RJ & Olson EN (2009). A Family of microRNAs Encoded by Myosin Genes Governs Myosin Expression and Muscle Performance. *Dev Cell* **17,** 662–673.

Van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J & Olson EN (2007). Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by a MicroRNA. *Science* **316,** 575–579.

Rosenberg MI, Georges SA, Asawachaicharn A, Analau E & Tapscott SJ (2006). MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol* **175,** 77–85.

Ruby JG, Jan CH & Bartel DP (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448,** 83–86.

Schneyer A, Tortoriello D, Sidis Y, Keutmann H, Matsuzaki T & Holmes W (2001). Follistatin-related protein (FSRP): a new member of the follistatin gene family. *Mol Cell Endocrinol* **180,** 33–38.

Schwartz JC, Younger ST, Nguyen N-B, Hardy DB, Monia BP, Corey DR & Janowski BA (2008). Antisense transcripts are targets for activating small RNAs. *Nat Struct 38 Mol Biol* **15,** 842–848.

Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N & Zamore PD (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115,** 199–208.

Schwarz DS, Hutvágner G, Haley B & Zamore PD (2002). Evidence that siRNAs Function as Guides, Not Primers, in the< i> Drosophila</i> and Human RNAi Pathways. *Mol Cell* **10,** 537–548.

Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E & Ambros V (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* **5,** R13.

Sher L (1998). The endogenous euphoric reward system that reinforces physical training: a mechanism for mankind's survival. *Med Hypotheses* **51,** 449–450.

Shibanuma M, Mashimo J, Mita A, Kuroki T & Nose K (1993). Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *Eur J Biochem FEBS* **217,** 13–19.

Shim KS (2015). Pubertal growth and epiphyseal fusion. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* **20,** 8–12.

Shiojima I & Walsh K (2006). Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev* **20,** 3347–3365.

Sidis Y, Schneyer AL, Sluss PM, Johnson LN & Keutmann HT (2001). Follistatin: essential role for the N-terminal domain in activin binding and neutralization. *J Biol Chem* **276,** 17718–17726.

Sidis Y, Tortoriello DV, Holmes WE, Pan Y, Keutmann HT & Schneyer AL (2002). Follistatin-related protein and follistatin differentially neutralize endogenous vs. exogenous activin. *Endocrinology* **143,** 1613–1624.

Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR & Ruvkun G (2000). The lin-41 RBCC Gene Acts in the C. elegans Heterochronic Pathway between the let-7 Regulatory RNA and the LIN-29 Transcription Factor. *Mol Cell* **5,** 659–669.

Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, Sutherland LB, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA & Olson EN (2010). Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci* **107,** 4218–4223.

Sundaram GM, Common JEA, Gopal FE, Srikanta S, Lakshman K, Lunny DP, Lim TC, Tanavde V, Lane EB & Sampath P (2013). "See-saw" expression of microRNA-198 and FSTL1 from a single transcript in wound healing. *Nature* **495,** 103–106.

Sweetman D, Goljanek K, Rathjen T, Oustanina S, Braun T, Dalmay T & Münsterberg A (2008). Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Dev Biol* **321,** 491–499.

Sylva M, Li VSW, Buffing AAA, van Es JH, van den Born M, van der Velden S, Gunst Q, Koolstra JH, Moorman AFM, Clevers H & van den Hoff MJB (2011). The BMP antagonist follistatin-like 1 is required for skeletal and lung organogenesis. *PloS One* **6,** e22616.

Sylva M, Moorman AFM & van den Hoff MJB (2013). Follistatin-like 1 in vertebrate development. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev* **99,** 61–69.

Tanaka M, Murakami K, Ozaki S, Imura Y, Tong X-P, Watanabe T, Sawaki T, Kawanami T, Kawabata D, Fujii T, Usui T, Masaki Y, Fukushima T, Jin Z-X, Umehara H & Mimori T (2010). DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (Drosophila) is a candidate receptor for follistatin-related protein/follistatin-like 1--analysis of their binding with TGF-β superfamily proteins. *FEBS J* **277,** 4278–4289.

Tsuchida K, Arai KY, Kuramoto Y, Yamakawa N, Hasegawa Y & Sugino H (2000). Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family. *J Biol Chem* **275,** 40788–40796.

Uhlén M et al. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347,** 1260419.

Umemoto T, Furutani Y, Murakami M, Matsui T & Funaba M (2011). Endogenous Bmp4 in myoblasts is required for myotube formation in C2C12 cells. *Biochim Biophys Acta* **1810,** 1127–1135.

Vasudevan S, Tong Y & Steitz JA (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* **318,** 1931–1934.

Wang Y, Li D, Xu N, Tao W, Zhu R, Sun R, Fan W, Zhang P, Dong T & Yu L (2011). Follistatin-like protein 1: a serum biochemical marker reflecting the severity of joint damage in patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* **13,** R193.

Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ & Wang K (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* **56,** 1733–1741.

Wightman B, Burglin TR, Gatto J, Arasu P & Ruvkun G (1991). Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during Caenorhabditis elegans development. *Genes Dev* **5,** 1813–1824.

Wightman B, Ha I & Ruvkun G (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. *Cell* **75,** 855–862.

De Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJ, van Achterberg TA, Sugino H, de Waele P, Huylebroeck D, Verschueren K & van den Eijnden-van Raaij AJ (1996). Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* **116,** 105–114.

Wu C, Macleod I & Su AI (2013). BioGPS and MyGene.info: organizing online, gene-centric information. *Nucleic Acids Res* **41,** D561–D565.

Xu J, Qi X, Gong J, Yu M, Zhang F, Sha H & Gao X (2012). Fstl1 antagonizes BMP signaling and regulates ureter development. *PloS One* **7,** e32554.

Yamasaki T, Yoshino H, Enokida H, Hidaka H, Chiyomaru T, Nohata N, Kinoshita T, Fuse M, Seki N & Nakagawa M (2012). Novel molecular targets regulated by tumor suppressors microRNA-1 and microRNA-133a in bladder cancer. *Int J Oncol* **40,** 1821–1830.

Yang J-S & Lai EC (2010). Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis in vertebrates. *Cell Cycle* **9,** 4455–4460.

Yang J-S, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, Papapetrou EP, Sadelain M, O'Carroll D & Lai EC (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **107,** 15163–15168.

Yang J-S, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, Chen KC & Lai EC (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA N Y N* **17,** 312–326.

Yang Y, Liu J, Mao H, Hu Y-A, Yan Y & Zhao C (2009). The expression pattern of Follistatin-like 1 in mouse central nervous system development. *Gene Expr Patterns GEP* **9,** 532–540.

Yi R (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17,** 3011–3016.

Zeng Y & Cullen BR (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA N Y N* **9,** 112–123.

Zhao Y, Samal E & Srivastava D (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* **436,** 214–220.