

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze,
Katedra buněčné biologie

Bakalářská práce



Charakteristika a distribuce mitochondriálních odpřahujících proteinů

Lukáš Alán

Školitel: RNDr. Petr Ježek, DrSc.

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky,

Oddělení biofyziky membránového transportu

2008

Velmi děkuji RNDr. Petru Ježkovi, DrSc., stejně jako všem svým spolupracovníkům z laboratoře biofyziky membránového transportu, AV ČR v Praze, za odborné vedení a cenné rady a připomínky, díky kterým mohla tato práce vzniknout.

Také bych chtěl poděkovat RNDr. Martinu Kalousovi, CSc., za přínosné konzultace.

1. Obsah

1.	Obsah.....	1
2.	Seznam použitých zkratek.....	2
3.	Abstrakt.....	3
	Abstract.....	4
4.	Úvod.....	5
5.	Mitochondrie.....	6
5.1.	Mitochondriální anatomie.....	6
5.2.	Krebsův cyklus.....	7
5.3.	Dýchací (elektrontransportní) řetězec.....	7
6.	Odpřahující proteiny.....	9
6.1.	UCP1.....	10
6.1.1.	Struktura.....	10
6.1.2.	Aktivita.....	11
6.1.3.	Mechanismus odpřažení.....	11
6.1.4.	Regulace transkripce.....	12
6.1.5.	Funkce UCP1 a fyziologie buňky a organismu.....	13
6.2.	UCP2.....	13
6.2.1.	Regulace transkripce.....	14
6.2.2.	Funkce UCP2 a fyziologie buňky.....	16
6.3.	UCP3.....	17
6.3.1.	Funkce UCP3 a fyziologie buňky.....	18
6.4.	UCP4.....	19
6.4.1.	Regulace exprese a odpřahující aktivity.....	19
6.5.	UCP5.....	20
6.5.1.	Regulace exprese, fyziologická funkce.....	20
6.6.	Biodistribuce UCPn.....	21
6.6.1.	Distribuce UCP1.....	21
6.6.2.	Distribuce UCP2.....	21
6.6.3.	Distribuce UCP3.....	22
6.6.4.	Distribuce UCP4.....	22
6.6.5.	Distribuce UCP5.....	22
7.	Diskuze.....	23
8.	Závěr.....	24
9.	Seznam Literatury.....	25

2. Seznam použitých zkratk

Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A
ADP	Adenozindifosfát
ATP	Adenozintrifosfát
AP-2	Transkripční faktor
BAT	Hnědá tuková tkáň
BMCP	Mozkový mitochondriální přenašečový protein
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CRE-2	cAMP response element
DIO-2	Dejodináza typu 2
DNA	Deoxiribonukleová kyselina
FADH ₂	Flavinadeninukleotid (redukováná forma)
GDP	Guanozindifosfát
GSIS	Glukózou stimulovaná inzulínová sekrece
GTP	Guanozintrifosfát
IL-1 β	Interleukin-1 β
LPS	Lipopolysacharid
MACP	Proteinová rodina mitochondriálních přenašečů
MK	Mastná kyselina
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
mtDNA	Mitochondriální DNA
MyoD	Myoblast determination protein
NADH	Nikotinamidadeninukleotid
obR	Leptinové receptory
pCREB	cAMP response element binding proteins
PGC-1	PPAR gamma koaktivátor 1
PPAR	Receptor stimulující proliferaci peroxizomů
PUMP	Rostlinný odpřahující mitochondriální protein
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
RT-PCR	Reverzní transkripce – polymerázová řetězová reakce
RXR	Receptor 9- <i>cis</i> -retinové kyseliny
Sp-1	Transkripční faktor
STAT	Signal Transducers and Activator of Transcription
TIM	Translokáza vnitřní mitochondriální membrány
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor α
TOM	Translokáza vnější mitochondriální membrány
TR- β	Receptor thyroidních hormonů
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina
UCP	Odpřahující protein

3. Abstrakt

Mitochondriální odpráhující proteiny (UCP) patří do proteinové rodiny mitochondriálních aniontových přenašečů. Nejdéle je znám UCP1 vyskytující se dominantně v hnědé tukové tkáni, kde se účastní netřesové termogeneze. V druhé polovině 90. let 20. století byly postupně objeveny další čtyři sekvenční homology tohoto proteinu s tkáňově specifickou distribucí. Funkce těchto „nových“ odpráhujících proteinů není stále úplně jasná. Předpokládá se, že pro každou tkáň má jednotlivá izoforma specifickou funkci.

UCP2 je nejvíce exprimován v makrofázích, mozku, slezině a bílé tukové tkáni. V buňkách syntetizujících tento protein by mělo docházet k mírnému snižování mitochondriálního membránového potenciálu a tedy i ke snižování tvorby reaktivních radikálů, regulaci vápníkové homeostázy a ovlivnění sekrece inzulínu v pankreatických β -buňkách. UCP3 lze nalézt v savčím kosterním svalu, srdci a v hnědé tukové tkáni. Hypotetickou funkcí třetího odpráhujícího proteinu by mělo být rovněž snižování ROS produkce, a mírném ovlivňování celkového tělesného energetického metabolismu.

UCP4 a UCP5 jsou nejvíce exprimovány v mozku, UCP5 byla nalezena v ještě dalších tkáních. Tyto dva proteiny by mohly hrát roli v ochraně nervových buněk snižováním ROS a dočasnou ochranou před nízkými teplotami.

Klíčová slova:

Odpráhující protein, UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, UCP5, mitochondrie, ROS, tkáňová distribuce, netřesová termoregulace

Abstract

Mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) belong to the superfamily of mitochondrial anion-carrier proteins. The longest known is UCP1, predominantly expressed in a brown adipose tissue, where it takes part in nonshivering thermogenesis. In the late 1990s were discovered other sequence homologs of UCP1 with tissue specific distribution. The Function of these „new“ uncoupling proteins is still unclear. It is assumed that each of isoforms have specific function depending on type of tissue.

UCP2 is mostly expresses in macrophages, brain, spleen and white adipose tissue. The cells synthesizing this protein should have lower mitochondrial membrane potential, which induce decreased production of reactive oxygen species and thanks these protein they could regulate calcium homeostasis and pancreatic β -cells has impaired insulin secretion. UCP3 is highly expressed in a skeletal muscle and, to a lesser extent, in a brown adipose tissue and heart. Hypotesized functions of the third uncoupling protein should be again mitigation ROS production and influence of whole body energy balance.

UCP4 and UCP5 were found predominantly in a brain but UCP5 occurs in other tissues. These two proteins could play an important role in protection of nerve cells. The UCP4 and UCP5 should decrease ROS production and protect aganinst temporary low temperatures.

Key words:

Uncoupling protein, UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, UCP5, mitochondria, ROS, tissue distribution, nonshivering termoregulation

4. Úvod

Všechny živé organizmy a buňky vyžadují nepřetržitý přísun vnější energie, kterou využívají k růstu, dělení a ochraně před nepříznivými vnějšími vlivy. Eukaryotické buňky jsou k této činnosti vybaveny speciální nepostradatelnou organelou nazvanou mitochondrie. Ačkoliv jsou mitochondrie téměř výhradním producentem ATP, nejrozšířenější formy buněčné energie, hrají také roli v jiných fyziologicky neméně významných procesech. Účastní se například buněčné signalizace a s ní spojenou pro buňku velmi důležitou programovanou smrtí, neboli apoptózou. Defekty mitochondriální DNA se mohou podílet na některých degenerativních chorobách, procesu stárnutí a vzniku nádorového bujení. Tím, že jsou centrem energetického metabolismu je také dána jejich role v regulaci tělesné váhy a v termogenezi. Není tedy pochyb, že mitochondrie hrají hlavní roli v molekulární fyziologii buňky a jejich dysfunkce způsobují množství patofyziologických stavů, ke kterým se řadí ateroskleróza, vysoký krevní tlak, ischemické poruchy, záněty, cystická fibróza, nádory, diabetes melitus druhého typu, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a další neurodegradativní poruchy.

Sekvenací genomů různých organismů byla umožněna analýza otevřených čtecích rámců, díky kterým bylo nalezeno mnoho nových proteinů s neznámou funkcí. Byly analyzovány proteinové rodiny na základě sekvenční homologie, mezi jinými i rodina mitochondriálních aniontových přenašečů (MACP), která se u člověka skládá ze 47 různých proteinů. Touto cestou byly postupně identifikovány čtyři „nové“ odpřahující proteiny, sekvenční homology k do té doby jedinému známému odpřahujícímu proteinu - termogeninu (dnes odpřahující protein 1 – UCP1). UCP1 je protein exprimovaný nejvíce v hnědé tukové tkáni, kde odpřahuje oxidativní fosforylaci a vytváří teplo cestou netřesové termogeneze. Bohužel fyziologická funkce nově objevených proteinů není ani po deseti letech známa. Bylo však vysloveno několik hypotéz nastiňujících jejich možné role v buněčné fyziologii. Například snižování produkce reaktivních radikálů, účast na netřesové termoregulaci, regulace tělesné váhy, regulace inzulinové sekrece atd.

Společně s odhalováním funkce odpřahujících proteinů probíhají studie tkáňové distribuce a porovnávání hladin těchto proteinů v jednotlivých tkáních. Bylo napsáno množství informací o výskytu mRNA a proteinu jednotlivých izoform odpřahujících proteinů v různých tkáních. Chybí však shrnutí těchto studií a také kvantitativní porovnání hladin odpřahujících proteinů mezi sebou. O shrnutí poznatků tkáňové distribuce mitochondriálních odpřahujících proteinů jsem se pokusil v závěru práce. Kvantitativní porovnání odpřahujících proteinů by bylo možné provést metodou kvantitativní RT-PCR, pomocí které můžeme zjistit koncentraci určité mRNA vzhledem k celkové mRNA vyizolované z dané tkáně.

5. Mitochondrie

Mitochondrie jsou semiautonorní organely, vyskytující se u eukaryotických organismů. Jejich původ není zcela znám, ale podle endosymbiotické teorie se odhaduje, že vznikly fagocytózou bakteriální buňky. Hlavní funkcí mitochondrie je zajišťovat energetický metabolismus buňky, dále se účastní mnoha dalších buněčných procesů, např. signálních kaskád, buněčného cyklu a buněčného růstu. Jako semiautonorní organely si mitochondrie ponechaly část DNA. U člověka jsou v mitochondrii kódovány dvě rRNA, 22 tRNA a 13 proteinů dýchacího řetězce, celková velikost mtDNA je 16,6kbp. Obecně je však velikost mitochondriálního genomu různá a nemusí nutně korespondovat s počtem genů kódovaných mtDNA. U rostlin může dosahovat velikost mtDNA až 366,9kbp, zatímco některé houby mají pouze 20kbp. Počet kopií mtDNA může dosahovat až několika tisíc molekul na buňku.

5.1. Mitochondriální anatomie

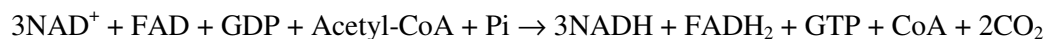
Velikost a tvar mitochondrií je značně proměnlivý v závislosti na jejich původu a metabolickém stavu. Mitochondrie většinou tvoří kontinuální retikulum, tvořené jedním či více částmi, které je značně dynamickým útvarem, mění svůj tvar a dokonce může fúzovat i s jinou mitochondrií. Její pohyb je spojen s pohybem mikrotubulů a určuje tak orientaci a distribuci v závislosti na buněčném typu. Organela je složena z kompartmentů, majících speciální funkce. Jsou to vnější membrána, mezimembránový prostor, vnitřní membrána, kristy a matrix. Vnější mitochondriální membrána obklopuje celou organelu a má stejný poměr proteiny – fosfolipidy jako eukaryotická plazmatická membrána. Obsahuje velké množství integrálních proteinů, tzv. porinů, které umožňují průchod molekulám do 10000 Daltonů. Větší proteiny procházejí pomocí multipodjednotkových proteinů typu TOM (translocase of outer membrane) a jejich signální sekvence. Mezimembránový prostor má díky vysoké permeabilitě vnější membrány podobné složení jako cytosol. Vnitřní mitochondriální membrána obsahuje proteiny 4 funkčních typů. Jsou to proteiny respiračního řetězce, ATP syntáza, specifické transportní proteiny regulující výměnu metabolitů s matrix a translokační komplex (TIM) pro import nascentních proteinů. Vnitřní mitochondriální membrána je obvykle hodně svinutá, tvořící množství vchlípenin, zvaných kristy. Tyto vchlípeniny zvyšují 3-5násobně povrch vnitřní membrány a poskytují tak více prostoru pro membránové proteiny dýchacího řetězce. Nejdůležitějším lipidem vnitřní membrány je glykolipid kardiolipin, který má 4 mastné kyseliny (MK) a pomáhá zvyšovat nepropustnost membrány. Vzniká tak regulovatelně propustná bariéra pro většinu iontů, metabolitů a nízkomolekulárních sloučenin. Výsledkem této bariéry je prostorové oddělení metabolických dějů mezi cytosolem a mitochondriemi. Vnitřní membrána také udržuje gradienty těchto látek, především však protonový, který je esenciální pro tvorbu ATP v procesu oxidativní fosforylace. Matrix je prostor uzavřený vnitřní membránou obsahující asi 2/3 mitochondriálních proteinů. Nalezneme zde například

enzymy Krebsova cyklu, enzymy zpracovávající pyruvát a aktivované mastné kyseliny, speciální mitochondriální ribozomy, t-RNA a mitochondriální DNA.

5.2. Krebsův cyklus

Krebsův cyklus je centrem většiny metabolických drah. Odpovídá za oxidaci většiny cukrů, mastných kyselin i aminokyselin a vytváří četné metabolické prekurzory. Do Krebsova cyklu mohou vstupovat tyto látky po degradaci na acetyl-CoA, který je za přítomnosti citrátsyntázy schopen reagovat s oxalacetátem za vzniku kyseliny citronové. Ta je součástí dalších reakcí Krebsova cyklu.

Stechiometrie odbourávání acetylové skupiny v KC:



Jedna acetylová skupina je tedy oxidována na dvě molekuly CO_2 , přičemž vzniká energeticky bohatá molekula GTP a 4 páry elektronů, tři páry elektronů v NADH a jeden pár v FADH_2 . Tato redukční činidla přenášejí energeticky bohaté elektrony do dýchacího řetězce.

5.3. Dýchací (elektrontransportní) řetězec

V dýchacím řetězci dochází k přenosu elektronů z NADH na komplex I (NADH dehydrogenáza) a z FADH_2 na komplex II (sukcinát – ubichinon oxidoreduktáza). Z těchto komplexů jsou elektrony přeneseny koenzymem Q na komplex III (koenzym Q – cytochrom c oxidoreduktáza) a dále cytochromem c na komplex IV (cytochrom c oxidáza), kde jsou 4 elektrony použity k redukci O_2 na dvě molekuly vody.

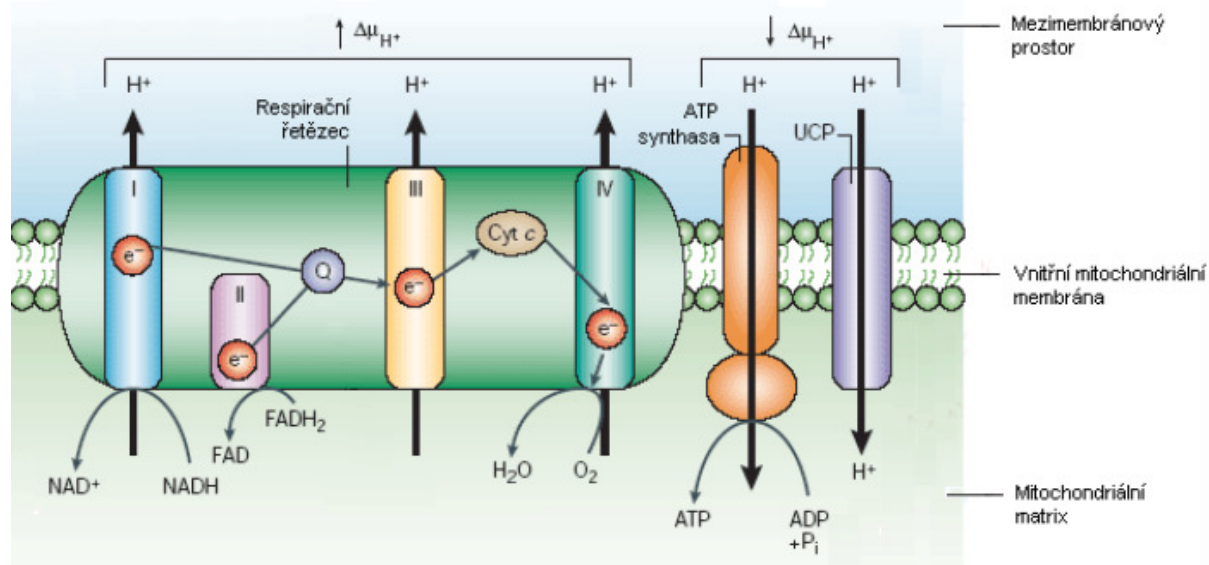
Zatímco elektrony procházejí redoxně aktivními jednotkami jednotlivých komplexů, dochází k transportu H^+ z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Vzniká tak protonový gradient na vnitřní mitochondriální membráně, tzv. protonmotivní síla. Ta je podle Mitchellovi chemiosmotické teorie spřažena se syntézou ATP. F_0 podjednotka mitochondriální ATPázy využívá zpětný tok protonů, který je převeden na rotaci podjednotky γ F_1 komplexu což způsobí konformační změny dalších podjednotek. Tyto změny potom zajišťují tvorbu ATP.

Elektrochemický gradient ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) je obvykle vyjadřován v jednotkách mV a její hodnoty se obecně pohybují mezi 150 a 200 mV. Z něj můžeme vypočítat také protonmotivní sílu Δp :

$$\Delta p = \frac{\Delta\mu_{\text{H}^+}}{F} = \Delta\Psi_m - 59\Delta pH_m \text{ [mV]},$$

kde F je Faradayova konstanta, $\Delta\Psi_m$ elektrický potenciál membrány a ΔpH_m chemický potenciál membrány. Maximální protonmotivní síly je dosaženo v tzv. stavu 4 za absence syntézy ATP a zpětného toku H^+ . Ke snížení protonmotivní síly dochází ve stavu 3, kdy je v mitochondrii spřažena

oxidace s fosforylací. V tomto stavu, kdy probíhá oxidativní fosforylace, je část Δp využívána pro syntézu ATP. Respirační kontrolou je nazýván mechanismus, kdy vyšší Δp zabraňuje dalšímu pumpování H^+ . Tím je zpětnovazebně snížena respirace. Naopak odpřažením nazýváme umělé zvýšení toku H^+ přes vnitřní membránu, která má za následek zvýšení respirace. Podmínkou spřažení mezi transportem elektronů a syntézou ATP je nepropustnost vnitřní mitochondriální membrány pro H^+ . Existují však látky s protonoforickou aktivitou, odpřahovače, které zvyšují propustnost membrány pro H^+ ionty. Způsobí tím odpřažení bez následné syntézy ATP, a tím disipaci energie na teplo, protože zpětný tok H^+ se neuskutečňuje ATP-syntázou, ale probíhá mimo ni. Klasickými odpřahovači jsou např. 2,4-dinitrofenol a karbonylkyanid-*p*-trifluoromethoxyfenylhydrazon. Odpřahovače narušením ustálené respirační kontroly urychlují respiraci a přenos elektronů a tím indukují tvorbu tepla, protože energie elektrochemického gradientu, která měla být původně použita k syntéze ATP, je použita k přenosu H^+ zpět do matrix. V průběhu fylogeneze se vyvinuly odpřahující proteiny, které slouží jako regulovatelné odpřahovače a mohou za jistých podmínek fyziologicky odpřahovat mitochondrie *in vivo* a tím disipovat energii. Nicméně jejich malé množství či inhibující regulace znemožní podstatnou disipaci.



Obr. 1. Oxidativní fosforylace (Upraveno z Krauss et al., 2005)

Během oxidativní fosforylace nevzniká pouze ATP a voda, ale uvolňuje se i tzv. superoxidový aniont $O_2^{\bullet-}$, což je radikál - látka obsahující nepárový elektron. Tento superoxidový aniont vytváří konjugovanou kyselinu HO_2^{\bullet} (hydroperoxylový radikál), jejíž nebezpečnost tkví v její schopnosti procházet membránou a unikat z mitochondrie. Zůstává-li v mitochondrii, kontinuálně poškozuje mtDNA a dostává-li se mimo ni, tak se při stresových situacích podílí na vzniku dalších radikálů a peroxidů (hydroxylový radikál $\bullet OH$, uhličitánový aniont $HCO_3^{\bullet-}$ atd.). $O_2^{\bullet-}$ vzniká např. autooxidací

ubisemichinonového radikálu na komplexu III. S vyšším potenciálem na membráně se vytváří více superoxidu. Je to dáno tím, že pomalejší tok elektronů umožní vyšší poločas života přechodných radikálů a tím umožní jejich reakci s kyslíkem. Proto při syntéze ATP i odpřažení je tvorba superoxidu snížena. Ve stavu 4, kdy je $\Delta\Psi$ vysoký, respirace limitována nedostatkem ADP, je tvorba superoxidu maximální. Superoxid je dismutován matrixovou MnSOD a CuZnSOD v mezimembránovém prostoru na H_2O_2 . H_2O_2 volně difunduje přes membrány a může být zdrojem vzniku dalších a reaktivnějších intermediátů, např. hydroxylových radikálů OH^\bullet . (Jezek a Hlavata, 2005).

6. Odpřahující proteiny

Mitochondriální odpřahující proteiny patří do skupiny MACF (mitochondrial anion carrier protein superfamily), která má přibližně 35 členů. Nejdéle znám je odpřahující protein 1 (UCP1), kterému se díky jeho schopnosti generovat teplo v hnědé tukové tkáni dříve říkalo thermogenin. S postupnou sekvenací lidského genomu se našli sekvenční homology k UCP1 a to UCP2, UCP3, UCP4 a UCP5 (také zvaný BMCP1 – brain mitochondrial carrier protein). Při srovnávání sekvenční podobnosti mají největší příbuznost s UCP1 proteiny UCP2 (59%) a UCP3 (57%). UCP4 a UCP5 mají sekvenční podobnost s UCP1 mnohem nižší a to 30% respektive 33% (Krauss *et al.*, 2005). Hlavní charakteristikou těchto proteinů však zůstává, že všechny mají tři blízce homologní části, které tvoří 6 α -helixů procházejících membránou, které jsou spojeny čtyřmi cytosolickými a třemi matrixovými segmenty. C a N konec proteinu směřuje na cytosolickou stranu membrány. Všechny proteiny MACF mají domény se specifickou sekvencí pro přenos energie; P-x-[DE]-x-[LIVAT]-[RK]-x-[LRH]-[LIVMFY], kde x je jakákoliv aminokyselina (Borecky *et al.*, 2001).

Tabulka 1: Chromosomová lokalizace, počet aminokyselin a homologie (vztažená k UCP1) jednotlivých odpřahujících proteinů.

	Chromosomová lokalizace			Počet aminokyselin			% homologie
	člověk	myš	krysa	člověk	myš	krysa	
UCP1	4	8	19	307	307	307	100%
UCP2	11	7	1	309	309	309	59%
UCP3	11	7	1	275 (UCP3S) 312 (UCP3L)	308	308	57%
UCP5 (BMCP1)	X	X	X	322 (UCP5S) 325 (UCP5L)	322	325	33%
UCP4	6	17	9	134	322	322	30%

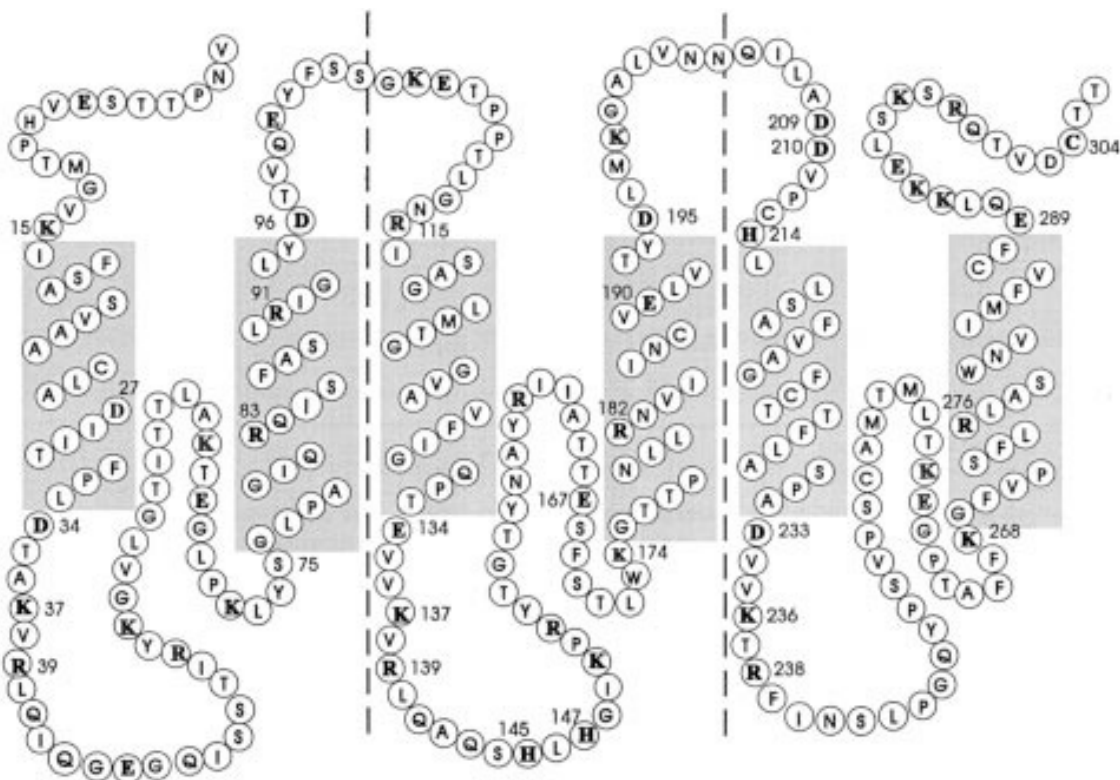
Proteiny z rodiny UCP, na rozdíl od některých jiných jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů, postrádají odštěpitelný mitochondriální importní signál. Informace o jejich určení je v první smyčce vyčnívající do matrix. Ta při vstupu do mitochondrie interaguje s Tom 20 (translocase of the outer mitochondrial membrane), což je receptor importního komplexu vnější mitochondriální membrány. Druhá mitochondriální smyčka také disponuje vazebným místem pro Tom 20 a je nepostradatelná i pro inzerci proteinu do vnitřní mitochondriální membrány (*Schleiff a McBride, 2000*).

Odpřahující proteiny se pravděpodobně vyvinuly z anion/anionových nebo anion/nukletidových přenašečů ještě před divergencí eukaryot na zvířata, rostliny a houby. Jako vývojově nejstarší se jeví savčí izoforma UCP4, jelikož je velmi příbuzný rostlinnému UCP3 *Arabidopsis thaliana* stejně jako odpřahující proteiny nalezené u *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* a hlenky *Dictyostelium discoideum*. Fylogenetické analýzy naznačují, že se rodina odpřahujících proteinů skládá z pěti podrodin. Jsou to savčí podrodiny I (UCP1, UCP2, UCP3) a IV (UCP5), rostlinné podrodiny UCP/PUMP podrodiny II a V, a pravděpodobně původní podrodina III (UCP4) (*Nogueira et al., 2005*).

6.1. UCP1

6.1.1. Struktura

Pochopení netřesové termoregulace, probíhající v savčí hnědé tukové tkáni (BAT) vedlo k potvrzení Mitchellovi chemiosmotické teorie a k objevení nového proteinu s odpřahující funkcí, odpřahujícího proteinu 1. Jeho gen je lokalizován na lidském chromozomu čtyři a v genomu myši se nachází na osmém chromozomu. V aktivní formě se pravděpodobně vyskytuje jako dimer. Molekulová hmotnost monomeru je 33 kDa. UCP1 se exprimuje exkluzivně v BAT, kde představuje až 14% množství proteinů vnitřní mitochondriální membrány.



Obr.2. Sekundární struktura UCP1 z hnědé tukové tkáně křečka (Klingenberg, 1999)

6.1.2. Aktivita

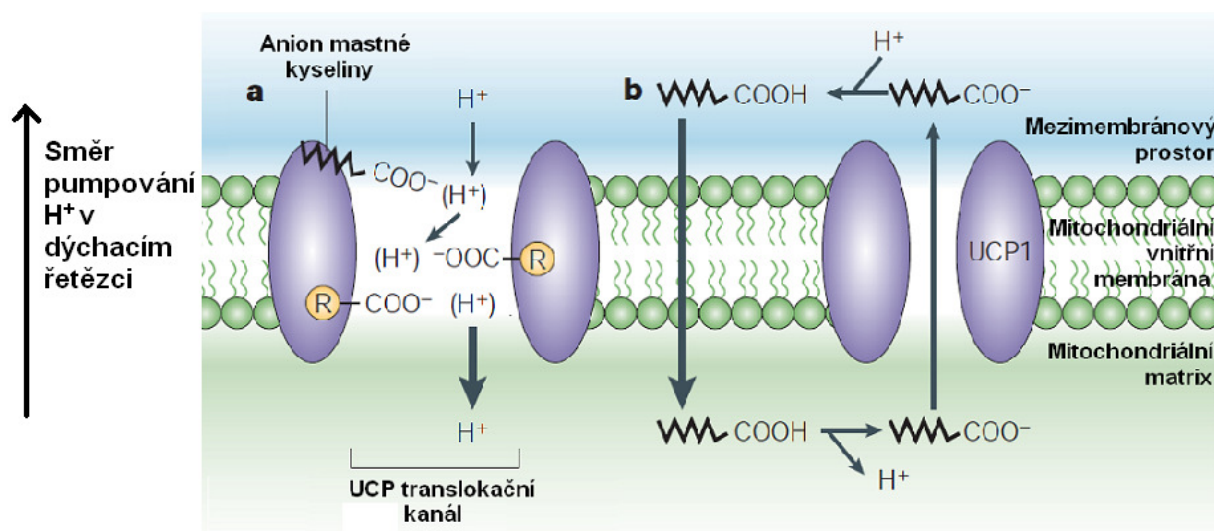
Aktivita UCP1 je regulována sympatickým nervovým systémem. Stimulace β -adrenergických receptorů katecholaminovými spouštěči koordinují buněčnou odpověď, která má dvě části. V první části je přes receptor asociovaný s G-proteinem aktivovaná adenylátcykláza, která produkuje cAMP. cAMP dále aktivuje hormon-senzitivní fosfolipázu, která uvolňuje mastné kyseliny z cytoplazmatické membrány. Mastné kyseliny mohou sloužit jako substrát nebo jako kofaktor (viz dále). Druhá část spočívá ve zvýšeném transportu a oxidaci energetických zdrojů, které vedou k tvorbě NADH a FADH_2 , redukčních agens důležitých pro tvorbu protonového gradientu. Inhibitory jsou purinové nukleosid di- a trifosfáty (ADP, GDP, ATP, GTP), které se váží s vysokou afinitou na nukleotid-vazebné místo UCP1 na cytosolické straně vnitřní mitochondriální membrány. Teoreticky by měly inhibovat UCP1 již milimolární koncentrace volného ATP a ADP (nevázané s Mg^{2+}). Problémem však je, že *in vivo* jsou jejich koncentrace mnohem nižší než při pokusech a tak se stále neví, zda UCP1 a jeho homology mohou být inhibovány těmito volnými purinovými nukleotidy (Krauss *et al.*, 2005)

6.1.3. Mechanismus odpražení

Mastné kyseliny (MK) tedy hrají při odpražení hlavní roli, kterou se pokoušejí vysvětlit dva rozdílné modely. Jedna z hypotéz, protony-pufrující model, považuje MK za prostetické skupiny pro

UCP1. Předpokladem je, že UCP proteiny mají translokační kanál, skrz který protony vstupují zpět do mitochondriální matrix. Protony se pohybují kanálem přeskoky přes záporně nabité aminokyseliny, které se nacházejí v kritických místech kanálu. Funkcí MK by mělo být importovat protony k translokačnímu kanálu a předávat je aminokyselinám (Klingenberg, 1999). Přesný mechanismus však zůstává neznámý. Nicméně hlavní myšlenkou zůstává přechod protonů skrz kanál odpřahujícího proteinu.

Druhá hypotéza (model cirkulace mastných kyselin) je založena na schopnosti protonovaných MK procházet membránou a vstupovat do matrix, kde se deprotonuje a vrací se přes UCP1 zpět do mezimembránového prostoru. Deprotonované MK se hromadí v matrix, jelikož nemohou díky svému zápornému náboji projít přes membránu a jejich jedinou možností je návrat zpět do mezimembránového prostoru skrz UCP1. UCP1 zde působí jako flipáza a společně s mastnými kyselinami vytváří cyklus, který snižuje protonový gradient na vnitřní membráně mitochondrie (Skulachev, 1999).



Obrázek 3. Dva modely translokace H⁺ pomocí volných mastných kyselin a UCP1. a – protony pufrující model, b – model cirkulace mastných kyselin (Krauss et al., 2005)

6.1.4. Regulace transkripce

V myším genu se nachází asi 200 bp dlouhý „enhancer element“ 2,3 - 2,5 kb před transkripčním počátkem. Podobný element se nachází také u potkana a člověka. V tomto místě se vážou různé členové jaderně-receptorové rodiny transkripčních faktorů, zahrnujících receptor γ stimulující proliferaci peroxizomů (PPAR γ), retinoidní X receptor (RXR) a thyroideální receptor (Lengacher et al., 2004). Jejich ligandy jsou syntetické thiazolidinediony, retinoidy a trijodthyronin. V současné době jsou známy 4 mechanismy prokazující noradrenergí stimulaci transkripční aktivity UCP1 enhanceru v diferenciované buňce hnědé tukové tkáně. Po noradrenální stimulaci nastává odpověď v podobě rychlého vzrůstu fosforylovaných pCREB (cAMP response element binding proteins) (Thonberg et

al., 2002). Rim a Kozak, objevili, že se pCREB váže jako homodimer na CRE2 místo v UCP1 enhancerové sekvenci a aktivuje tak transkripci (*Rim a Kozak, 2002*). Jako druhý mechanismus noradrenální transkripční aktivace je vazba jaderného faktoru (NFE212) na NF-E2 místo v enhanceru. NFE212 je také aktivován cAMP-závislou cestou. Další dva mechanismy opět vycházejí z cAMP a jejich transkripční faktory jsou dejodináza typu 2 (DIO-2) a PPAR γ koaktivátor (PGC-1). Vystavení chladu způsobí noradrenální stimulaci DIO-2 aktivity a vzrůst syntézy trijodthyroninu, který stimuluje aktivitu thyroidních receptorů β (TR β) v UCP1 enhanceru. Současně se zvyšuje hladina PGC-1 mRNA, jejíž produkt se účastní iniciace při PPAR γ /RXR α a TR β /RXR α transkripční aktivaci (*Klingenspor, 2003*).

6.1.5. Funkce UCP1 a fyziologie buňky a organismu

UCP1 je tedy výhradně exprimován v BAT, kde má nezastupitelnou úlohu v netřesové termogenezi. Tento fakt byl dokázán na transgenních Ucp1 *-/-* myších, které po vystavení teplotě 4° C utrpěly těžkou hypotermií. (*Enerback et al., 1997*). Kromě toho vede fenotyp Ucp1 *-/-* k rozvoji obezity (*Lowell et al., 1993*).

UCP1 je v BAT exprimován v obrovském množství. Žádný jiný odpřahující protein ani z daleka nedosahuje takových koncentrací. Např. množství UCP3 je ve svalu (tkáň s jednoznačně nejvyšší expresí ucp3 u myši) asi 200x až 700x nižší než množství UCP1 v BAT (*Mattiasson a Sullivan, 2006*). Také poměr množství UCP1 k množství ATPázy je v BAT posunut silně ve prospěch UCP1. V jiných tkáních jsou odpřahující proteiny až v stonásobné minoritě a nemohou tak účinně ovlivňovat termoregulaci. Výskyt UCP1 v jiných tkáních bude pravděpodobně spojen pouze se snižováním membránového potenciálu a ne s termogenezí.

6.2. UCP2

V roce 1997 byl objeven UCP1 homolog nazvaný UCP2 (*Fleury et al., 1997*). S UCP1 a UCP3 sdílí 59 respektive 73% aminokyselinové homologie. UCP2 je exprimován v rozličných množstvích v mnoha tkáních a buněčných typech. Množství mRNA však vždy nekoreluje s množstvím proteinu, děje se tak pravděpodobně vlivem traslační down-regulace (*Pecqueur et al., 2001*). Odhaduje se, že ve tkáních je UCP2 přítomen v množstvích o 1 či 2 řády nižších než UCP1 (*Zackova et al., 2003*).

Gen myši ucp2 má přibližně 6,3 kb a obsahuje osm exonů a sedm intronů. Promotor se nachází ve vzdálenosti 369 bází před iniciačním kodónem a postrádá TATA a CAAT boxy, ale je bohatý na GC páry. Tato promotorová oblast by měla podporovat nasedání iniciačních faktorů transkripce, a to Sp1, AP-2, AP-1, CREB, MyoD a glukokortikodní elementy – GRE. Sekvenční analýza 3' konce

potom odhalila polyadenilační signál (ATAAA) ve vzdálenosti 257 bp za stop kodómem (*Yamada et al., 1998*).

6.2.1. Regulace transkripce

UCP2 mRNA byla nalezena v různých koncentracích ve většině studovaných tkáních. Hladina mRNA vždy nekoreluje s koncentrací proteinu, ale může být důležitým spojovníkem při hledání fyziologické funkce UCP2.

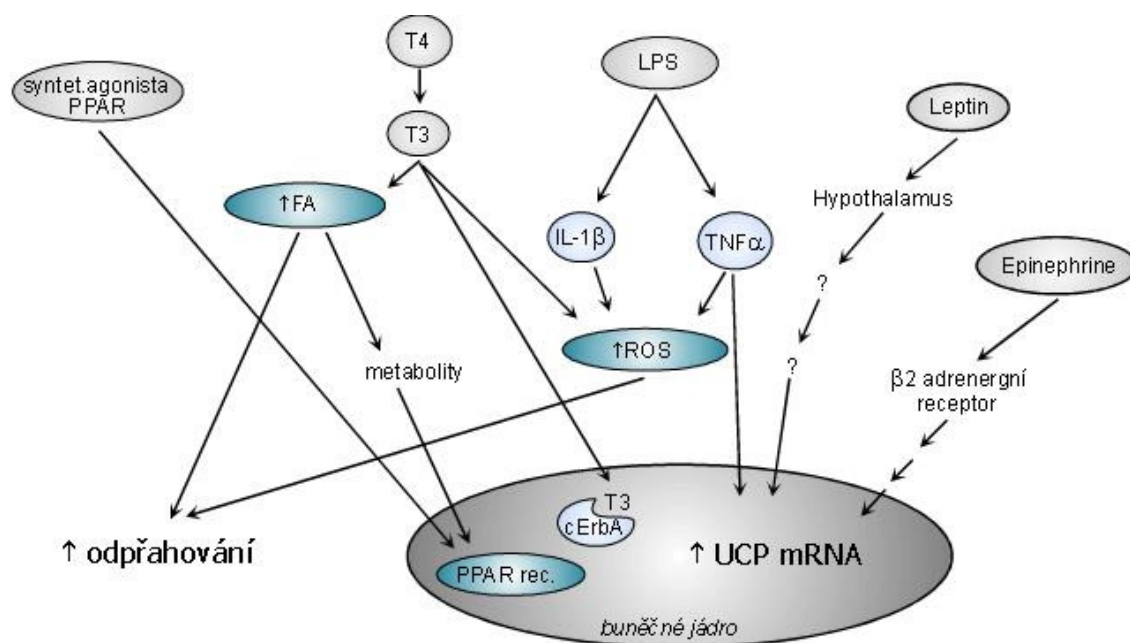
Jedním z regulátorů transkripce druhého odpráhuujícího proteinu je leptin. Je to 16 kDa velký proteinový hormon, který hraje klíčovou úlohu v energetickém metabolismu celého organismu. Je syntetizovaný a sekretovaný adipocyty, placentou, trávicím traktem a kosterním svalstvem. Množství leptinu v krevní plazmě je závislé na tělesné hmotnosti a množství tuku, pohlaví (u žen je syntetizován dvakrát víc než u mužů) a výdeji energie. Ve většině případů obezity je hladina leptinu vysoká. Působení leptinu na buňku je zprostředkováno transmembránovými receptory (obR) rodiny cytokinových receptorů. Leptinové receptory jsou produkty diabetes genů. Alternativním sestřihem může vzniknout nejméně 6 izoform leptinových receptorů. Leptinový receptor prostřednictvím Janus kinázy, která fosforyluje Tyr obR umožní asociaci a následnou fosforylaci STAT (druzí posli), kteří v jádře regulují genovou expresi vybraných genů. Bylo objeveno, že leptin pozitivně reguluje transkripci *ucp2* a v tukové tkáni zvyšuje koncentraci UCP2 mRNA až 10 krát. V pankreatických ostrůvcích zvyšuje 6krát koncentraci UCP2 mRNA a také zvyšuje mitochondriální a peroxizomální oxidační enzymy, zatímco snižuje mRNA esterifikačních enzymů. V hnědé tukové tkáni zvyšuje leptin hladiny mRNA UCP1 a UCP3 (*Ježek, 2002*).

Druhým regulátorem jsou thyroïdní hormony. Tyto malé hormony, odvozené od tyroxinu, vystupují v široké škále biologických procesů. U savců ovlivňují především vývoj a energetický metabolismus. Na mitochondriální úrovni stimuluje respiraci zvýšením aktivity dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace. Thyroïdní hormony T3 a T4 reagují se specifickými receptory thyroïdních hormonů (TR α a TR β). Mezi T3 responzivní elementy patří i *ucp*, avšak přesný mechanismus regulace ještě není známý. Thyroïdní hormony mají pravděpodobně dvě funkce, jednou je iniciace transkripce a druhou by měla být indukce odpráhuující aktivity. Tyto hormony by měli být agonisty dalších UCPs aktivátorů, např. v indukci uvolňování volných MK apod. Na zkoumaných krysách měl T3 největší efekt na expresi *ucp2* v srdci, svalu a bílé tukové tkáni, zatímco v ledvině a játrech byl efekt nulový (*Lanni et al., 1997; Lanni et al., 2003*).

Dalším způsobem regulace transkripce jsou mastné kyseliny, polynenasycené mastné kyseliny a eikosanoidy pomocí jaderných receptorů. Tyto receptory jsou nazvány PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) a v buňce fungují jako transkripční faktory. PPAR hrají důležitou roli v regulaci buněčného vývoje, diferenciaci a metabolismu vyšších organismů. Zatím byly nalezeny tři typy těchto receptorů, typ alfa exprimovaný v játrech, ledvinách, srdci, svalu a tukové tkáni, typ beta

je exprimován především v mozku, tukové tkáni a pokožce a konečně typ gamma, který má další tři podtypy γ_1 (srdce, sval, tlusté střevo, ledviny, slinivka a slezina), γ_2 (tuková tkáň), γ_3 (makrofágy, tlusté střevo a bílá tuková tkáň). Všechny typy PPAR tvoří heterodimery s retinoidním X receptorem (RXR) a váží se specificky na DNA. Vazebná doména těchto jaderných receptorů typu zinc-fingers se váže na konzervovanou sekvenci AGGTCAAGGTCA, kde X je náhodný nukleotid. Oblast promotoru *ucp* obsahuje elementy typické pro aktivní promotory genu energetického metabolismu, jako S1 element, sterol responsivní element a dvojitý E-BOX motiv, který je pravděpodobně klíčový pro funkci promotoru (Medvedev *et al.*, 2001). UCP2 gen je regulován pomocí PPAR α a PPAR γ , a to ve všech tkáních, ve kterých se vyskytuje (kosterní sval, srdeční sval, bílá tuková tkáň, slezina, játra, atd.).

Dalším regulátorem transkripce druhého odpráhujičho proteinu jsou cytokiny. Cytokiny jsou signální proteiny a glykoproteiny, které působí jako hormony a neurotransmitery. Cytokinová proteinová rodina je složena hlavně z malých, solubilních proteinů s velikostí mezi 8 a 30 kDa. Cytokiny jsou kritické pro působení vrozené a získané imunitní odpovědi. Jsou často sekretovány buňkami imunitního systému, které se již v minulosti setkaly s patogenem. V regulaci transkripce UCP2 se uplatňují pyrogenní cytokiny, např. TNF α a IL-1 β . Touto cestou bakteriální lipolysacharid (LPS, stimulant infekce) zvyšuje hladinu UCP2 mRNA 28krát v játrech a 5krát ve svalu a tuku (Faggioni *et al.*, 1998). Tento efekt se nevyskytuje v jaterních makrofázích, ale byl prokázán v izolovaných hepatocytech (Cortez-Pinto *et al.*, 1998). Po stimulaci LPS se hladina mRNA i proteinu UCP2 snižuje u makrofágů (Kizaki *et al.*, 2002) a analogicky se zvyšuje hladina ROS. Zvýšená hladina ROS indukce expresi NO-syntázy a následně NO, který, jak známo, je mediátorem mikrobicidní a tumorocidní imunitní odpovědi makrofágů.



Obrázek č.4. Regulace transkripce UCP2 mRNA

6.2.2. Funkce UCP2 a fyziologie buňky

Do dnešního dne bylo vysloveno mnoho hypotéz o funkci nových odpřahujících proteinů a zvláště o UCP2. Tyto hypotézy zahrnují jak účast na energetické rovnováze a kontrole metabolismu, který může být důležitý pro metabolické poruchy jako jsou obezita a diabetes tak i účast na ochraně buněk před oxidativním stresem. Primární fyziologická a patofyziologická funkce UCP2 bude pravděpodobněji spojena s regulací syntézy ATP, ATP/ADP poměru, regulací metabolismu glukózy a mastných kyselin a s produkcí volných radikálů (*Boss et al., 1997*).

Hlavním mechanismem, kterým může UCP2 promlouvat do fyziologie buňky, je vzhledem k jeho nízkému množství velmi mírné odpražení oxidačních procesů od fosforylačních a nepatrná disipace energie ve formě tepla. Tímto způsobem odpřahující proteiny mírně snižují membránový potenciál na vnitřní mitochondriální membráně a produkci mitochondriálního ATP, která dále ovlivňuje buňku a v případě pankreatických β -buněk i celý organismus.

Jelikož UCP2 ovlivňuje mitochondriální membránový potenciál, mohl by touto cestou ovlivňovat dynamiku Ca^{2+} iontů a jejich vtok do mitochondrie. Vápník je klíčovým prvkem buněčných signálních kaskád a podílí se i na indukci buněčné smrti. Mitochondriální příjem vápníku je řízen Nernstovou rovnicí. Snížení potenciálu o 30 mV by mělo snížit množství mitochondriálního vápníku 10krát. Problémem však zůstává, zda dokáže UCP2 za fyziologických podmínek depolarizovat membránu v takovém rozsahu. UCP2 by mohl spíše redukovat rychlost příjmu Ca^{2+} (*Nicholls, 2002*).

Mitochondriální produkce ROS je přímo spjata s membránovým potenciálem a hyperpolarizace (vysoké $\Delta\psi$) zvyšuje a podporuje tvorbu ROS. Při vysokém $\Delta\psi$ nejsou protony delší dobu pumpovány z matrix elektrontransportním řetězcem (proti elektrochemickému gradientu), tak že je elektronový transport zpomalen nebo zastaven. Výsledkem je hromadění intermediátů, které zůstávají delší dobu v redukovaném stavu a zvyšuje se tak příležitost úniku elektronů z těchto meziproduktů, redukujících O_2 a zvyšujících produkci ROS. Profesor Skulachev první navrhl, že by jemné odpražení mohlo být prospěšné při snižování tvorby radikálů. (*Skulachev, 1991*).

Generování radikálů z dýchacího řetězce vede k oxidativním změnám a peroxidaci lipidů. Hydroperoxydy mastných kyselin jsou uvolněné fosfolipázou A a aktivují jemné odpražení způsobené UCP2. Sníží se tak membránový potenciál, tvorba radikálů a oxidativní ničení buňky (*Mattiasson a Sullivan, 2006*).

Dalším důležitým fyziologickým jevem, ve kterém vystupuje druhý odpřahující protein, je glukózou stimulovaná sekrece inzulínu (GSIS) v pankreatických β -buňkách. Proces začíná absorpcí glukózy v tenkém střevě. Glukózovou homeostázu udržují především pankreatické β -buňky sekretující inzulín v poměru k rostoucí koncentraci glukózy v krvi. β -buňky vnímají hladinu glukózy na základě rostoucího poměru ATP/ADP. To vede k uzavírání K^+ ATP dependentních kanálů plasmatické membrány a také k depolarizaci aktivujících vápníkové kanály. Tento indukovaný vtok Ca^{2+} iontů aktivuje inzulínovou sekreci. Inzulín snižuje produkci v játrech a stimuluje glukózový příjem ve svalu

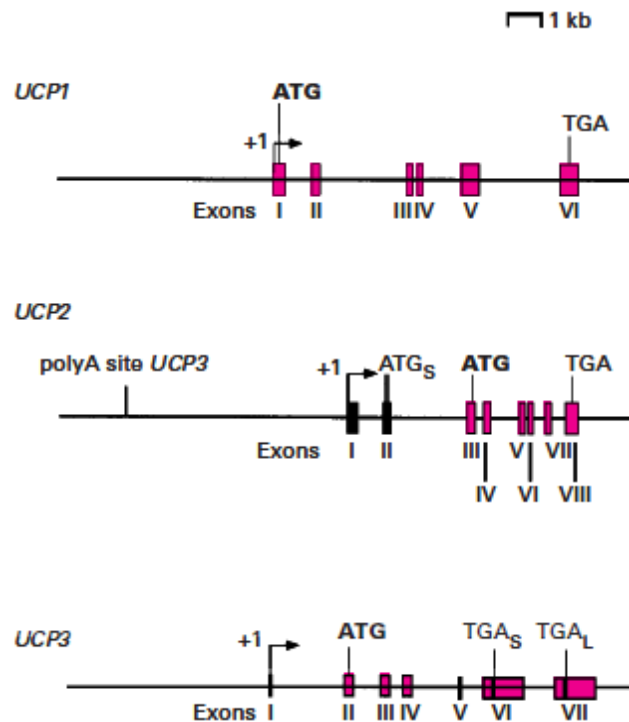
a v bílé tukové tkáni. Uměle zvýšená exprese UCP2 potvrdila, že sníží-li se koncentrace ATP v β -buňkách sníží se také intenzita uzavírání K^+ ATP dependentních kanálů, které snižuje GSIS. To je způsobeno pravděpodobně inhibicí ATP dependentního uvolňování inzulínových granulí a exocytózy (Chan *et al.*, 2001). UCP2 by tedy v tomto procesu mohl vystupovat jako negativní regulátor.

Z dalších možných fyziologických funkcí by mohlo být UCP2 zapojeno v neuroprotekcí (mozkový infarkt, traumatická mozková poranění, parkinsonova choroba a epileptické záchvaty) a kardiovaskulárních chorobách (ateroskleróza a srdeční infarkt) (Mattiasson a Sullivan, 2006).

6.3. UCP3

Třetí odpráhující protein byl objeven v roce 1997 (Boss *et al.*, 1997), sekvenčně odpovídá charakteristikám MACP rodiny (obsahuje sekvence odpovídající transmembránovým helixům, nukleotid-vazebnou doménu apod.). Aminokyselinová sekvenční podobnost s UCP1 je 57% a s UCP2 je 73%. Myší UCP3 cDNA má 308 aminokyselin, celkovou velikost 34 kDa a s lidskou formou UCP3 sdílí 85,6% aminokyselinové sekvenční podobnosti.

UCP3 gen se u myši nalézá na 7 chromozómu, u lidí na 11 chromozómu a u potkana na prvním chromozómu. Myší gen má 7 exonů, z nichž je první nekódující. Klonování cDNA UCP3 odhalilo, že lidský gen je exprimován ve dvou alternativních sestřihových variantách, které vznikají odlišným sestřihem posledního intronu. Předpokládá se vznik dvou proteinů UCP3_L dlouhého 312 aminokyselin a UCP3_S s 275 aminokyselinami postrádající poslední doménu. Obě dvě mRNA jsou exprimovány v podobných množstvích v lidském kosterním svalu (Ricquier a Bouillaud, 2000).



Obrázek č.5. Exony a introny UCP1, UCP2 a UCP3 genů (Ricquier a Bouillaud, 2000)

Myší UCP3_L cDNA má 5' nepřekládanou oblast dlouhou 197 bp, otevřený čtecí rámeček dlouhý 927 bp a 3' nepřekládanou oblast velkou 1323 bp s polyadenylačním signálem AATAAA a poly A koncem. Promotor transkripce se nachází 6,7 kbp před začátkem transkripce. Pozice míst pro transkripční regulátory jsou od promotoru UCP1 odlišně rozmístěné. Předpokládá se, že ucp3 promotor nemá klasický TATA-box, ale má E-box, vazebná místa pro myocyte enhancer faktor 2, PPAR receptory, thyroïdní hormony a dvě místa pro vazbu MyoD (*Yoshitomi et al., 1998*).

Regulace transkripce probíhá obdobně jako u UCP2, a to přes PPAR receptory (kosterní sval), leptinem (hnědá tuková tkáň), cytokiny (kosterní sval), thyroïdními hormony (T3 regulací u kosterního svalu a hnědé tukové tkáně a po vystavení chladu pouze v hnědé tukové tkáni).

6.3.1. Funkce UCP3 a fyziologie buňky

Stejně jako u druhého odpřahujícího proteinu, není u UCP3 dodnes přesně známá jeho funkce. První hypotetická funkce vyplynula z jeho homologie k UCP1. UCP3 by tedy měl způsobovat snížení membránového potenciálu a odpřažení dýchacího řetězce od ATP-syntázy. Několik studií však prokázalo, že UCP3 nezpůsobuje bazální protonové odpřažení (samovolný přechod protonů přes membránu, způsobený vysokým membránovým potenciálem) ale funguje pouze na základě intracelulární signalizace (*Bezair et al., 2007*). Otázkou také zůstává, jakým mechanismem je odpřažení dosaženo (viz výše – protony pufrující model nebo model cirkulace mastných kyselin).

Mnoho studií ukazuje na roli UCP3 v metabolismu mastných kyselin. První hypotéza byla popsána Hagenem a Harperem v roce 2001. Ti se domnívají, že UCP3 poskytuje cestu pro nabytečné MK za podmínek nadbytečného zásobení mitochondrií mastnými kyselinami. Když jsou mitochondrie vystaveny vysokému příjmu MK, LCFA-koenzym A (long chain fatty acid anion-koenzym A) se hromadí v matrix a blokuje tak omezené zásoby koenzymu A (*Himms-Hagen a Harper, 2001*). Předpokládá se tedy, že by mohl UCP3 ve spolupráci s mitochondriální thioesterázou uvolňovat koenzym A a exportovat MK anionty z matrix. Export MK pomocí UCP3 by tedy nedovoloval větší rychlost oxidace mastných kyselin, ale mohl by tak snižovat membránový potenciál a také produkci kyslíkových radikálů.

Druhou možnou funkcí třetího odpřahujícího proteinu by mohla být ochrana před reaktivními kyslíkovými radikály, vznikajícími v elektrontransportním řetězci (viz výše). Tvorba superoxidů je podporována vysokou buněčnou koncentrací kyslíku nebo vysoce redukovanými intermediáty v dýchacím řetězci. Proto mechanismus, který redukuje membránový potenciál, také snižuje tvorbu radikálů vzniklých v elektrontransportním řetězci (*Boveris a Chance, 1973*). Snížení potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně, způsobené odpřažením UCP3 by tedy mohlo snižovat aktuální tvorbu ROS (*Bezair et al., 2007*).

Při absenci aktivátorů protonového transportu, by mohly být odpřahující proteiny propustné pro některé jiné ionty. V případě UCP3, exprimovaného ve svalových glykolytických vláknech může být

tento protein pasivním pyruvátovým transportérem a zajišťovat rovnováhu mezi glykolýzou a oxidativní fosforylací. Pyruvát je tedy pomocí UCP3 transportován do cytosolu, kde je přeměněn na laktát. K tomuto závěru přispěl fakt, že je zde UCP3 exprimováno ve vysokém počtu a že některé známky funkce UCP3 zmizely po odebrání glukózy z média (Jezek a Borecky, 1998; Mozo et al., 2006). Mitochondrie v glykolytických buňkách by mohly být vybaveny samoinhibujícím mechanismem, který odstraňuje mitochondriální substrát společně se zvyšováním polarizace a mohly by tak mírnit Pasteurův efekt, kterým mitochondrie inhibují glykolýzu.

V souvislosti s metabolismem glukózy je možné, že UCP3 může zlepšovat inzulínovou citlivost v buňkách kosterního svalu (Costford et al., 2006).

Díky svým vlastnostem by mohl být třetí odpřahující protein zapojen v procesech stárnutí (tvorba ROS), netřesové termoregulaci (podobnost s UCP1) a glukózovém metabolismu (transport pyruvátu, senzitivizace buněk kosterního svalu).

6.4. UCP4

Čtecí rámeček pro lidský gen *ucp4* definuje mitochondriální membránový protein o 323 aminokyselinách s předpokládanou molekulovou hmotností 36,06 kDa a pI v hodnotě 9,28. Sekvenční podobnost s *ucp1* je 29%, s UCP2 33% a s UCP3 34%. Jako jiné odpřahující proteiny má i UCP4 šest transmembránových domén, tři proteinové motivy typické pro mitochondriální přenašeče a doménu vázající nukleotidy. V potkaním mozku jsou exprimovány tři různé izoformy, které se od sebe odlišují na karboxylovém konci. U člověka se lokus tohoto genu nachází na 4. chromozomu, u myši na 17. a u krysa na 9. chromozomu (Mao et al., 1999).

6.4.1. Regulace exprese a odpřahující aktivity

Při chladové expozici roste hladina UCP4 mRNA již po první hodině a zůstává zvýšena po dalších 24 hodin, zatímco UCP5 mRNA se v myším mozku a játrech zvedne po jedné hodině a vydrží ve zvýšené koncentraci pouze šest hodin (Yu et al., 2000).

Tepelná aklimatizace nebo dlouhodobé hladovění nevede k žádným změnám v hladinách UCP4 mRNA. *In vitro*, UCP4 transfekované buňky mají snížený mitochondriální membránový potenciál. Je tedy možné, že je UCP4 odpovědné za mitochondriální odpražení v mozkových buňkách a může být zapojeno v adaptivní termoregulaci a produkci tepla v mozku.

6.5. UCP5

Mezi savci je proteinem s velmi konzervovanou sekvencí. Krysí UCP5 má vysokou homologii (přes 95%) s myšími a savčími proteiny. Pro lidský gen byly nalezeny 3 proteinové izoformy, L pro dlouhou verzi proteinu, S pro krátký protein a SI, což je krátká verze s vloženou sekvencí. V myších tkáních byly nalezeny pouze 2 izoformy, L a S. L forma je tvořena 325 aminokyselinami a je nejvíce příbuzná s ostatními odpřahujícími proteiny. S UCP3 a UCP4 má 39% aminokyselinovou identitu a má všechny domény jako zbylé odpřahující proteiny. Navíc má unikátní hydrofóbní sekvenci 22 aminokyselin, která nebyla nalezena u jiných UCP. Její funkce není známá, ale pravděpodobně bude sloužit k ukotvení v membráně. UCP5S je kratší o tři aminokyseliny (23 až 25 aminokyselina – valin, serin, glycin - jsou deletovány). UCP5SI (353 AA) má mezi třetí a čtvrtou transmembránovou doménou vložený inzert o velikosti 31 AA a navíc postrádá stejné tři AA jako jako UCP5S. Inzertovaná sekvence obsahuje hydrofóbní AA a může být zapojena v interakcích s mitochondriální membránou.

U člověka, potkana i myši se nachází na chromozomu X. U člověka se nachází v blízkosti genu *ant2*, což je také gen pro protein mitochondriální přenašečové rodiny. Je možné, že jeden z těchto genů vzniknul duplikací druhého. Expres UCP5L v různých tkáních značně kolísá, zatímco v ledvině zaujímá 12% veškeré UCP5 mRNA, tak v mozku je exprimována pouze tato izoforma. Lidský kosterní sval má přibližně stejné množství S a L formy. V lidském mozku je dominantní dlouhá L forma, ale v mozku myši je z 98% exprimována krátká forma S (*Yu et al., 2000*).

Při zkoumání schopnosti redukovat mitochondriální membránový potenciál byly mezi těmito dvěma formami nalezeny rozdíly. Ačkoliv buňky transfekované lidským UCPS vykazovaly zřetelný pokles membránového potenciálu, velikost změn však byla menší než u stejného pokusu s UCP5L. Stejně dopadl pokus i pro myší izoformy. Tento náleznaznačuje, že UCP5S sice snižuje membránový potenciál, ale tříaminokyselinová (VSG) delece bude ovlivňovat kvalitu její odpřahující aktivity (*Yu et al., 2000*).

6.5.1. Regulace exprese, fyziologická funkce

Hladovění snižuje metabolickou rychlost a mělo by tedy snižovat i množství exprimovaných odpřahujících proteinů. Po 24 hodinách hladovění měly myši průkazně nižší hladinu UCP5 mRNA. Po podání stravy se hladina opět vrátila do normálu.

Tučná dieta jasně zvyšuje hladinu UCP5 mRNA v játrech u myši rezistentních k obezitě. V mozku nebyly nalezeny žádné změny.

Chlad zvedá hladinu UCP5 mRNA po jedné hodině v mozku i v játrech a zůstává ve zvýšeném stavu ještě 6 hodin po působení tohoto vnějšího činitele. UCP5 je ve zvýšeném množství exprimován také v lidských varlatech, kde pravděpodobně pomáhá udržovat tepelnou homeostázu důležitou pro spermatogenezi. Na rozdíl od UCP2 stimulace LPS nezvyšuje hladinu mRNA UCP5 (*Yu et al., 2000*).

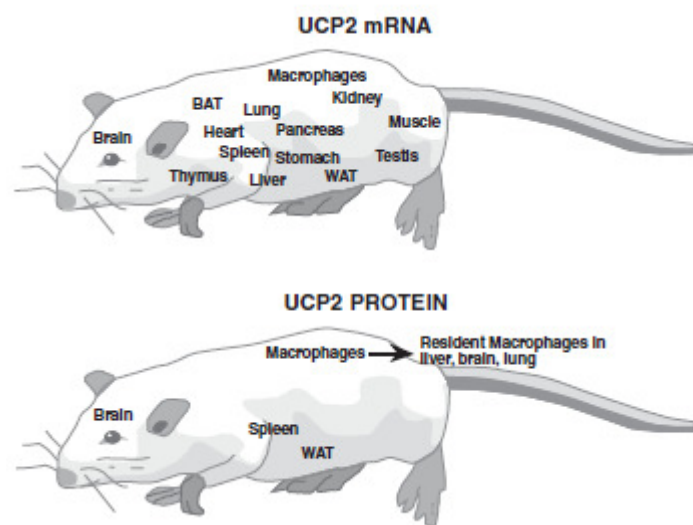
6.6. Biodistribuce UCPn

6.6.1. Distribuce UCP1

První odpráhující protein se exprimuje především v hnědé tukové tkáni, kde plní svou hlavní funkci a to tvorbu tepla při netřesové termogenezi. Nedávno byl tento protein objeven i v buňkách lidské pokožky a jejich buněčných derivátech. (Mori *et al.*, 2008) a v buňkách brzlíku (Adams *et al.*, 2008). Ucp1 mRNA byla v malém množství nalezena také v lidském mozku a v kosterním svalu (Lengacher *et al.*, 2004). Předpokládá se, že funkce v těchto tkáních slouží obdobně jako u UCP2 k ochraně před masivní produkcí ROS.

6.6.2. Distribuce UCP2

UCP2 mRNA byla nalezena v mnoha různých tkáních. Relativně velké množství UCP2 mRNA bylo nalezeno v slezině, brzlíku, pankreatických β -buňkách, srdci, plicích, bílé tukové tkáni, žaludku, varlatech a v menším množství v mozku, ledvinách, játrech a svalu. Exprimovaný protein byl detekován v mozku, slezině, bílé tukové tkáni a v makrofázích, díky kterým může být tento protein přítomen v játrech, mozku a v plicích (Fleury a Sanchis, 1999). Je však nutné podotknout, že kvůli vysoké homologii nebyly nalezeny dostatečně specifické protilátky, které by dokonale rozlišily UCP1, UCP2 a UCP3. UCP2 je totiž detekovatelná některými protilátkami proti UCP1a protilátky proti UCP2 mohou reagovat s ostatními členy UCP skupiny (Fleury a Sanchis 1999).



Obrázek č.6. Schematický náčrt distribuce UCP2 mRNA a proteinové exprese (Mattiasson & Sullivan, 2006)

6.6.3. Distribuce UCP3

UCP3 je vysoce exprimován v kosterním svalu, méně v hnědé tukové tkáni a v srdci (*Bezaire et al., 2001*) a v případě kosterního svalu je exprese UCP3 srovnatelná s hladinami jiných běžných proteinů této tkáně. Avšak i mezi jednotlivými druhy svalů se najdou rozdíly v hladinách UCP3. Více je UCP3 exprimován v glykolytických (lýtkový sval, tibialis anterior a fascia latae) než v oxidativních svalech (plochý sval lýtkový). UCP3 byla v malém množství také detekována v potkaním srdci, ledvině a bílé tukové tkáni (*Boss et al., 1997*).

6.6.4. Distribuce UCP4

Transkripty UCP4 byly nalezeny pouze v mozku. Vysoké koncentrace UCP4 mRNA byly nalezeny ve většině částí mozku, pouze v míše, prodloužené, kalózním tělese a černé hmotě se UCP4 mRNA neobjevila. Zajímavé je, že UCP2 transkripty jsou nejvíce zastoupeny právě v těchto tkáních mozku. V oblastech kde byly hladiny UCP2 mRNA nejvyšší se UCP4 mRNA transkribovala v nejméně a naopak (*Mao et al., 1999*).

6.6.5. Distribuce UCP5

Lidský UCP5 se vyskytuje ve většině tkáních mozku, nejméně však v míše a kalózním tělese. Relativně vysoké hladiny UCP5 mRNA byly detekovány v mozkové kůře, mozečku a v oblastech frontálního a temporálního laloku. Z dalších tkání lidského těla byl nalezen ve varlatech, ledvinách, děloze, srdci, plicích, žaludku, játrech a kosterním svalu. Nejvyšší exprese však dosahuje v mozku a ve varlatech. V myších tkání byla UCP5 mRNA detekována v mozku, varlatech, bílé tukové tkáni, ledvinách, hnědé tukové tkáni, kosterním svalu, játrech a v srdci. Ve všech těchto myších tkáních byla dominantní S forma UCP5, zatímco v lidských tkáních je přednostně transkribována delší forma UCP5L. UCP5SI byla detekována pouze v černé hmotě lidského mozku a u myši nebyla nalezena v žádné tkáni (*Yu et al., 2000*).

7. Diskuze

Ačkoliv již bylo o těchto proteinech napsáno mnoho publikací, tak spousta problémů zůstává nevyřešena nebo rozpracována a nebo existuje několik nezávislých teorií. Tyto někdy navzájem se vylučující teorie provází většinu odvětví výzkumu mitochondriálních proteinů, ať už se jedná o jejich základní funkci (např. zda tyto proteiny opravdu odpřahují mitochondriální protonový gradient) nebo také o jejich tkáňovou distribuci. Dalšími základními měřeními by se mělo pokračovat v poznávání těchto proteinů, jak z funkčního hlediska tak i ze strany jejich tkáňové distribuce. Zkoumání tkáňové distribuce a regulace exprese by mělo přinést informace, které pomohou odhalit pravou funkci odpřahujících proteinů. Do dnešního dne nebyla vydána publikace, která by souhrnně stanovovala hladiny mRNA nebo proteinů v jednotlivých tkáních. Výjimkou snad zůstává práce S. Lengachera, který kvantifikoval mRNA izoformy odpřahujících proteinů v mozku, hnědé tukové tkáni a v kosterním svalu.

Problémy se stanovením proteinů jsou způsobeny především nevhodnými protilátkami, které zatím nemají potřebnou specifitu, aby rozlišily tak homologní proteiny. Hladiny mRNA jednotlivých izoform byly sice zkoumány, ale vždy pouze poměrově a ne vždy zcela exaktně. Určitý průlom by mohlo přinést měření metodou kvantitativní RT-PCR (použita také Lengacherem). Tato metoda umožňuje určit množství mRNA dané izoformy ve vztahu k objemu celého transkriptu, tzn. procentuální množství izoformy vzhledem k množství celkové mRNA. K hledání funkcí odpřahujících proteinů by také mohla pomoci kvantifikace mRNA v knock-outových myších. Je ovšem nutné přihlídnout k faktu, že hladiny mRNA těchto genů nemusí vždy korespondovat s hladinami proteinů jednotlivých izoform.

Toto téma se tak stalo návrhem pro mou budoucí diplomovou práci, ve které by byly exaktně změřeny koncentrace mRNA jednotlivých izoform v knock-outových a původních kmenech myší a potkanů.

8. Závěr

V současné době je popisováno několik typů mitochondriálních odpřahujících proteinů nalezených jak u rostlin a savců, tak i u ryb, ptáků, hub a prvoků. Tato práce se zabývá savčími mitochondriálními odpřahujícími proteiny. Shrnuje současné znalosti regulace transkripce jednotlivých proteinů, jejich tkáňovou distribuci a předpokládané funkce v různých tkáních. V savčích genomech bylo identifikováno 5 mitochondriálních odpřahujících proteinů.

První z nich byl popsán v 70. letech 20. století. Jeho funkce je těsně spjata s funkcí hnědé tukové tkáně, kde disipuje protonový gradient na vnitřní mitochondriální membráně a vytváří tak teplo využívané savci v netřesové termogenezi. V průběhu sekvenace lidského genomu byly nalezeny další čtyři proteiny odvozené na základě sekvenční homologie k prvnímu odpřahujícímu proteinu. Tyto homologe nejsou v žádné tkáni exprimovány v takovém množství jako UCP1 v hnědé tukové tkáni a tedy nestačí pro termogenní funkci. Předpokládá se tedy že by měli mít v různých tkáních odlišné funkce.

Druhý odpřahující protein byl nalezen ve větší koncentraci v makrofázích, mozku, slezině a bílé tukové tkáni. V těchto tkáních může hrát roli v při snižování tvorby reaktivních radikálů, regulování vápníkové homeostázy a regulace sekrece inzulínu v pankreatických β -buňkách. UCP3 je nejvíce exprimován v kosterním svalstvu, srdci a hnědé tukové tkáni, kde by se měl účastnit snižování produkce ROS a celkové energetické homeostázy. UCP4 a UCP5 jsou nejvíce exprimovány v mozku, UCP5 byla nalezena ještě v dalších tkáních, jako jsou varlata, ledviny, děloha, srdce a další. Tyto dva proteiny by mohly hrát roli v ochraně nervových buněk snižováním ROS.

Díky svým vlastnostem byly odpřahující proteiny zkoumány i z hlediska terapeutického využití. Nabízí se diabetes mellitus druhého typu, kdy UCP2 v pankreatických β -buňkách snižuje inzulínovou sekreci, zvýšená exprese odpřahujících proteinů v endoteliálních buňkách by mohla pomáhat předcházet ateroskleróze, v mozku a srdci by zvýšená exprese těchto proteinů měla předcházet ischemické buněčné smrti. Samozřejmě se hledá využití odpřahujících proteinů při regulaci tělesné váhy.

9. Seznam Literaturny

- Adams AE, Hanrahan O, Nolan DN, Voorheis HP, Fallon P & Porter RK (2008). Images of mitochondrial UCP 1 in mouse thymocytes using confocal microscopy. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 115-117.
- Bezaire V, Hofmann W, Kramer JK, Kozak LP & Harper ME (2001). Effects of fasting on muscle mitochondrial energetics and fatty acid metabolism in Ucp3(-/-) and wild-type mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E975-982.
- Bezaire V, Seifert EL & Harper ME (2007). Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J* **21**, 312-324.
- Borecky J, Maia IG & Arruda P (2001). Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants. *Biosci Rep* **21**, 201-212.
- Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P & Giacobino JP (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* **408**, 39-42.
- Boveris A & Chance B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**, 707-716.
- Cortez-Pinto H, Yang SQ, Lin HZ, Costa S, Hwang CS, Lane MD, Bagby G & Diehl AM (1998). Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 313-319.
- Costford SR, Chaudhry SN, Salkhordeh M & Harper ME (2006). Effects of the presence, absence, and overexpression of uncoupling protein-3 on adiposity and fuel metabolism in congenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E1304-1312.
- Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME & Kozak LP (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* **387**, 90-94.
- Faggioni R, Shigenaga J, Moser A, Feingold KR & Grunfeld C (1998). Induction of UCP2 gene expression by LPS: a potential mechanism for increased thermogenesis during infection. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 75-78.
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D & Warden CH (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* **15**, 269-272.
- Fleury C & Sanchis D (1999). The mitochondrial uncoupling protein-2: current status. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 1261-1278.
- Himms-Hagen J & Harper ME (2001). Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**, 78-84.

- Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, Tsushima RG, Pennefather PS, Salapatek AM & Wheeler MB (2001). Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* **50**, 1302-1310.
- Jezeq P (2002). Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins--UCPn. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1190-1206.
- Jezeq P & Borecky J (1998). Mitochondrial uncoupling protein may participate in futile cycling of pyruvate and other monocarboxylates. *Am J Physiol* **275**, C496-504.
- Jezeq P & Hlavata L (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2478-2503.
- Kizaki T, Suzuki K, Hitomi Y, Taniguchi N, Saitoh D, Watanabe K, Onoe K, Day NK, Good RA & Ohno H (2002). Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9392-9397.
- Klingenberg M (1999). Uncoupling protein--a useful energy dissipator. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 419-430.
- Klingenspor M (2003). Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol* **88**, 141-148.
- Krauss S, Zhang CY & Lowell BB (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 248-261.
- Lanni A, De Felice M, Lombardi A, Moreno M, Fleury C, Ricquier D & Goglia F (1997). Induction of UCP2 mRNA by thyroid hormones in rat heart. *FEBS Lett* **418**, 171-174.
- Lanni A, Moreno M, Lombardi A & Goglia F (2003). Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett* **543**, 5-10.
- Lengacher S, Magistretti PJ & Pellerin L (2004). Quantitative rt-PCR analysis of uncoupling protein isoforms in mouse brain cortex: methodological optimization and comparison of expression with brown adipose tissue and skeletal muscle. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 780-788.
- Lowell BB, V SS, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP & Flier JS (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* **366**, 740-742.
- Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH & Pan G (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* **443**, 326-330.
- Mattiasson G & Sullivan PG (2006). The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxid Redox Signal* **8**, 1-38.
- Medvedev AV, Snedden SK, Raimbault S, Ricquier D & Collins S (2001). Transcriptional regulation of the mouse uncoupling protein-2 gene. Double E-box motif is required for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent activation. *J Biol Chem* **276**, 10817-10823.
- Mori S, Yoshizuka N, Takizawa M, Takema Y, Murase T, Tokimitsu I & Saito M (2008). Expression of Uncoupling Proteins in Human Skin and Skin-Derived Cells. *J Invest Dermatol*.

- Mozo J, Ferry G, Studeny A, Pecqueur C, Rodriguez M, Boutin JA & Bouillaud F (2006). Expression of UCP3 in CHO cells does not cause uncoupling, but controls mitochondrial activity in the presence of glucose. *Biochem J* **393**, 431-439.
- Nicholls DG (2002). Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1372-1381.
- Nogueira FT, Borecky J, Vercesi AE & Arruda P (2005). Genomic structure and regulation of mitochondrial uncoupling protein genes in mammals and plants. *Biosci Rep* **25**, 209-226.
- Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F & Miroux B (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* **276**, 8705-8712.
- Ricquier D & Bouillaud F (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* **345 Pt 2**, 161-179.
- Schleiff E & McBride H (2000). The central matrix loop drives import of uncoupling protein 1 into mitochondria. *J Cell Sci* **113 (Pt 12)**, 2267-2272.
- Skulachev VP (1991). Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* **294**, 158-162.
- Skulachev VP (1996). Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* **397**, 7-10.
- Thonberg H, Fredriksson JM, Nedergaard J & Cannon B (2002). A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *Biochem J* **364**, 73-79.
- Yamada M, Hashida T, Shibusawa N, Iwasaki T, Murakami M, Monden T, Satoh T & Mori M (1998). Genomic organization and promoter function of the mouse uncoupling protein 2 (UCP2) gene. *FEBS Lett* **432**, 65-69.
- Yoshitomi H, Yamazaki K & Tanaka I (1998). Cloning of mouse uncoupling protein 3 cDNA and 5'-flanking region, and its genetic map. *Gene* **215**, 77-84.
- Yu XX, Mao W, Zhong A, Schow P, Brush J, Sherwood SW, Adams SH & Pan G (2000). Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *FASEB J* **14**, 1611-1618.
- Zackova M, Skobisova E, Urbankova E & Jezek P (2003). Activating omega-6 polyunsaturated fatty acids and inhibitory purine nucleotides are high affinity ligands for novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J Biol Chem* **278**, 20761-20769.