

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program
Fyziologie a patologická fyziologie

**Možnosti indukce UCP2 (uncoupling protein 2) v hepatocytech potkana
v podmínkách *in vivo***

**Possibilities of UCP2 (uncoupling protein 2) induction in rat hepatocytes in *in vivo*
conditions**

Mgr. Radka Bolehovská

Školitel: prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.

Hradec Králové, 2012

Obhajoba dne:

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 31. května 2012

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí dizertační práce paní prof. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a připomínky. Dále PharmDr. Lence Plíškové za možnost odborné konzultace a Mgr. Monice Pospíšilové za pomoc při experimentálním provedení. Ráda bych také poděkovala své rodině za pomoc a trpělivost, díky které jsem mohla tuto práci dokončit.

Obsah

Použité zkratky	7
1. Úvod	11
2. Literární přehled	13
2.1. Mitochondrie a buněčná respirace	13
2.2. Uncoupling proteiny	19
2.2.1. Historie uncoupling proteinů a jejich charakteristika	19
2.2.2. Struktura UCP2 proteinů a genů	23
2.2.3. Lokalizace UCP2	30
2.2.4. UCP2 a játra	33
2.2.5. Možné funkce UCP2	34
2.2.5.1. Adaptivní netřesová termogeneze	35
2.2.5.2. Regulace oxidace mastných kyselin	36
2.2.5.3. Regulace produkce reaktivních kyslíkových radikálů	38
2.2.5.4. Zapojení UCP2 do imunitní odpovědi – zánětu	39
2.2.5.5. UCP2 a diabetes mellitus typ 2	41
2.2.5.6. Regulace tělesné hmotnosti	44
2.2.5.7. UCP2 a prevence aterosklerózy, stárnutí	45
2.2.5.8. UCP2 a rakovina	46
2.2.5.9. UCP2 a neuroprotektce	48
2.2.6. Možnosti ovlivnění exprese UCP2	50
2.2.6.1. Hladovění a obezita	50
2.2.6.2. Chlad	51
2.2.6.3. Nukleotidy	52
2.2.6.4. Inzulín	52
2.2.6.5. Mastné kyseliny a PPAR	53
2.2.6.6. Leptin	55
2.2.6.7. Hormony štítné žlázy	56
2.2.6.7.1. Jaderné receptory pro trijodtyronin	58
2.2.6.7.2. Mitochondriální vazebná místa pro trijodtyronin	59
2.2.6.7.3. Stimulace transkripce tyroidními hormony	60
2.3. Regenerace jater	61

3. Cíle práce	63
4. Experimentální část	64
4.1. Materiál a metody	64
4.1.1. Pokusná zvířata, schémata experimentů a odběr vzorků	64
4.1.2. Stanovení enzymové aktivity mGPDH	66
4.1.2.1. Izolace jaterních mitochondrií	66
4.1.2.2. Stanovení koncentrace bílkovin	67
4.1.2.3. Spektrofotometrické stanovení enzymové aktivity mGPDH	68
4.1.3. Stanovení množství mGPDH pomocí western blotu	68
4.1.4. Izolace RNA	70
4.1.5. Stanovení RNA mGPDH pomocí northern blotu	72
4.1.6. Stanovení RNA UCP2	74
4.1.6.1. Reverzní transkripce	74
4.1.6.2. Kontrola účinnosti reverzní transkripce pomocí polymerázové řetězové reakce	77
4.1.6.3. Real-time PCR	82
4.1.6.3.1. Real-time PCR pro UCP2	83
4.1.6.3.2. Výběr housekeepingového genu a jeho real-time PCR	86
4.1.6.3.3. Vyhodnocení výsledků real-time PCR pro UCP2 a housekeepingový gen	88
4.1.7. Stanovení koncentrace celkového a volného trijodtyroninu	88
4.1.8. Provedení parciální hepatektomie	89
4.1.9. Statistické vyhodnocení výsledků	90
4.2. Výsledky	91
4.2.1. Výsledky stanovení mGPDH	91
4.2.1.1. mGPDH po jednorázovém podání trijodtyroninu	91
4.2.1.2. mGPDH po opakovaném podání trijodtyroninu	92
4.2.2. Výsledky stanovení mRNA UCP2	96
4.2.2.1. Schémata pokusů	96
4.2.2.2. Výsledky optimalizace reverzní transkripce a její kontroly	97

4.2.2.3.	Výsledky optimalizace real-time PCR specifické pro UCP2	100
4.2.2.4.	Výběr housekeepingového genu pro real-time PCR	102
4.2.2.5.	Výsledky exprese UCP2 v jaterní tkáni po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu	105
4.2.2.6.	Výsledky exprese UCP2 v jaterní tkáni po aplikaci tří dávek trijodtyroninu	108
4.2.2.7.	Výsledky exprese UCP2 v jaterní tkáni po parciální hepatektomii	110
5.	Diskuze	112
6.	Závěr	121
7.	Literatura	123

Použité zkratky

A	ampér
A/J	kmen inbrední myši A/J rezistentní k obezitě
A/min.	absorbance v čase
ADP	adenosindifosfát
Ala55Val	záměna alaninu za valin v pozici 55
AMP	adenosinmonofosfát
AMV	reverzní transkriptáza z ptačího myeloblastického viru
ATP	adenosintrifosfát
B2M	β -2-mikroglobulin
B6	kmen inbrední myši C57BL/6J náchylné k obezitě
BAT	hnědá tuková tkáň
BHQ	nefluorescenční zhášec (z angl. Black Hole Quencher)
BMCP1	mozkový mitochondriální přenašečový protein 1 (z angl. brain mitochondrial carrier protein 1) nebo-li uncoupling protein 5
BMI	index tělesné hmotnosti
bp	počet párů bází
BSA	hovězí sérum albumin
CCCP	karbonyl-kyanid-m-chlorofenylhydrazon
cDNA	copy DNA (komplementární DNA) vzniklá přepisem <i>in vitro</i> ze sekvence RNA
cM	centiMorgan
CoA	koenzym A
CoQ	koenzym Q
Ct	threshold cyklus
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DCPIP	dichlorfenolindofenol
dCTP	deoxycytidintrifosfát
DEPC	diethylpyrokarbonát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DIT	dijodtyrozinu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNP	2,4-dinitrofenol

dNTPs	směs nukleotidů (deoxyribonukleosidtrifosfátů)
DTT	dithiotreitol
dTTP	deoxytymidintrifosfát
E	účinnost real-time polymerázové řetězové reakce
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
FAD, FADH ₂	flavinadenindinukleotid (oxidovaná a redukováná forma)
FAM	6-karboxyfluorescein
FCCP	karbonylkyanid- <i>p</i> -trifluoromethoxyfenylhydrazon
FFA	volné mastné kyseliny
FMN	flavinmononukleotid
FN	Fakultní nemocnice
FRET	fluorescenčně rezonanční přenos energie
fT ₃	volný trijodtyronin
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
GDP	guanosindifosfát
GMP	guanosinmonofosfát
GTP	guanosintrifosfát
H ⁺	vodíkový kation, proton
HG	housekeepingový gen
HPRT1	hypoxantin-fosforibosyl-transferáza 1
HRE	hormon responsivní element
IgG	imunoglobulin G
kDa	zkratka jednotky tisíc Daltonů (kilo Dalton)
KsJ	kmen inbrední myši C57BL/KsJ rezistentní k obezitě
LF	Lékařská fakulta
LMF	lipidy mobilizující faktor
LPS	lipopolysacharid
MACP	metabolické přenašeče vnitřní mitochondriální membrány (z angl. Mitochondrial Anion Carrier Proteins)
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
mGPDH	mitochondriální glycerofosfátdehydrogenáza
MIT	monojodtyrozin
M-MLV	reverzní transkriptáza z Moloney myšího leukemického viru

MnSOD	mangan-superoxid-dismutáza
MOPS	4-morfolinpropansulfonová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
NAD ⁺ , NADH	nikotinamidadenin dinukleotid (oxidovaná a redukována forma)
NDP	nukleotiddifosfát
NK	negativní kontrola
NMDA	N-metyl-D-aspartátový receptor
NTP	nukleotidtrifosfát
ob	mutovaný gen pro leptin
ORF (uORF)	otevřený čtecí rámec (uORF, z angl. upstream open reading frame)
OXPHOS	proces oxidační fosforylace
p	krátké raménko chromozomu
<i>p</i>	statistická významnost
PCR	polymerázová řetězová reakce
PH	parciální hepatektomie
<i>P_i</i>	anorganický fosfor
PPAR	receptory aktivované peroxizomovými proliferátory
PPRE	responsivní elementy pro peroxizomové proliferátory
q	dlouhé raménko chromozomu
Q	zhášec (z angl. quencher)
R	zářič (z angl. reporter)
RE	poměr relativní exprese
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkripce
RXR	retinoidní nukleární receptor X
SDS	dodecylsulfát sodný
SRE	steroly regulovaný element
SREBP	protein vázající steroly regulovaný element
SSC	fyzilogický roztok citrátu sodného
SURF1	surfeit 1

T ₃	3,5,3'-trijodtyronin
T ₄	tyroxin
TBE	elektroforetický pufr složený z TRIS, EDTA a kyseliny borité
TBG	globulin vázající tyroxin
TBP	TATA box vázající protein
TIM	translokáza vnitřní mitochondriální membrány
TNF	tumor nekrotizující faktor
TOM	translokáza vnější mitochondriální membrány
TR	trijodtyroninový receptor
TRE	responsivní element pro tyroidní hormony
TRIS	Trizma base (Tris(hydroxymethyl)-aminometan)
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
tT ₃	celkový trijodtyronin
U	mezinárodní jednotka (unit)
UCP	uncoupling protein (odpřahující protein)
UCPs	uncoupling proteiny (odpřahující proteiny)
UNG	uracil-N-glykosyláza
V	volt
ϵ_{λ}	molární absorpční koeficient

Zkratky dusíkatých bází

A	adenin
C	cytosin
G	guanin
T	thymin

Zkratky aminokyselin

D	kyselina asparagová
E	kyselina glutamová
H	histidin
I	isoleucin
N	asparagin
Q	glutamin
R	arginin
T	threonin

1. Úvod

Jedním z nejvýznamnějších procesů probíhajících v mitochondriích všech eukaryotických buněk je tvorba adenosintrifosfátu (ATP), který je hlavním energetickým donorem endergonických reakcí v buňkách. Tvorba ATP vyžaduje těsné spřažení dvou procesů probíhajících v mitochondriích - oxidace substrátů mitochondriálními dehydrogenázami a fosforylace ADP na ATP s využitím energie membránového potenciálu vytvořeného dýchacím řetězcem, tj. elektronovým transportním systémem. Ten se skládá ze 4 komplexů – komplex I (NADH-dehydrogenáza), komplex II (sukcinátdehydrogenáza), komplex III (ubichinon-cytochrom *c*-oxidoreduktáza), komplex IV (cytochromoxidáza). Oxidace živin (sacharidů, lipidů, proteinů) vede až k tvorbě redukovaných kofaktorů (NADH + H⁺ a FADH₂). Ty následně předávají elektrony komplexům I a II, odkud jsou předávány na kyslík dalšími komplexy III a IV. Protony uvolněné oxidací vodíku jsou transportovány komplexy I, III a IV přes vnitřní mitochondriální membránu a vytváří tak membránový elektrochemický potenciál. Následně je energie protonového gradientu vnitřní mitochondriální membrány využita komplexem V k syntéze ATP z ADP a Pi a protony jsou tak transportovány zpět do matrix. Transport každých dvou elektronů vede k vytvoření takového protonového gradientu, který postačuje k syntéze tří molekul ATP (Echtay, 2007).

Část energie elektrochemického gradientu však nemusí být využita pro tvorbu ATP. Protony přenesené komplexy dýchacího řetězce ven z mitochondrie jsou v tomto případě transportovány zpět do matrix póry ve vnitřní mitochondriální membráně. Protony tím obcházejí dráhu ATP syntézy a energie nevyužitá pro tvorbu ATP se nevratně uvolňuje ve formě tepla. Tento proces může představovat až 20 % bazálního metabolismu, má svoji fyziologickou roli a patří mezi významné mechanismy tepelné homeostázy.

Odpřažení respirace od fosforylace může být způsobeno toxickými lipofilními ionofory, některými endogenními faktory nebo různými mitochondriálními přenašečovými proteiny jako například adeninnukleotidtranslokázou a zejména uncoupling proteiny (UCPs, odpřahující proteiny), které tak mohou regulovat membránový potenciál (Ricquier a Bouillaud, 2000 A; Nübel a Ricquier, 2006; Echtay, 2007), a tím i podíl energie uvolňované ve formě tepla.

Uncoupling proteiny patří tedy do skupiny aniontových přenašečů, které zvyšují permeabilitu vnitřní mitochondriální membrány pro protony, čímž snižují účinnost energetické přeměny a snižují potenciál pro tvorbu ATP. Odprážení oxidační fosforylace v mitochondriích hnědé tukové tkáně (BAT) bylo poprvé popsáno v roce 1967 Smithem a Lindbergem. V roce 1976 Nicholls a spol. identifikovali v mitochondriích BATu 32-kDa protein, nazvaný thermogenin (dnes uncoupling protein 1, UCP1) (Ricquier a Bouillaud, 2000 B; Mikulová a Hainer, 2001). V roce 1997 byl poté objeven uncoupling protein 2 a 3, doposud již bylo popsáno pět homologních proteinů označovaných jako UCP1 až UCP5. Kromě těchto savčích odpráhujících proteinů byly také popsány rostlinné UCP jako např. StUCP v *Solanum tuberosum* a AtUCP v *Arabidopsis thaliana* (Ricquier a Bouillaud, 2000 A).

Naše práce je zaměřena na studium uncoupling proteinu 2. Tento protein je exprimován ve všech orgánech, tedy i v játrech, které jsou hlavním zájmem skupiny pracovníků Ústavu fyziologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Toto pracoviště se již po řadu let věnuje experimentální hepatologii, především studiu regenerace jater a mechanismů hepatotoxického účinku různých látek. Všechny tyto energeticky náročné děje významným způsobem ovlivňuje také UCP2 nejenom vzhledem k dostupnosti potřebné energie, ale také se podílí na významných fyziologických procesech souvisejících např. s proliferací buněk nebo buněčnou smrtí (apoptózou).

Hlavním cílem experimentální části mé práce bylo zavést na pracovišti molekulárně biologické metody pro sledování exprese mRNA UCP2, pomocí které jsme následně kvantitativně zjišťovali míru exprese v jaterní tkáni potkana po aplikaci jedné nebo tří dávek trijodtyroninu v různých časových intervalech. V neposlední řadě jsme také studovali kinetiku exprese mRNA UCP2 po parciální hepatektomii.

2. Literární přehled

2.1. Mitochondrie a buněčná respirace

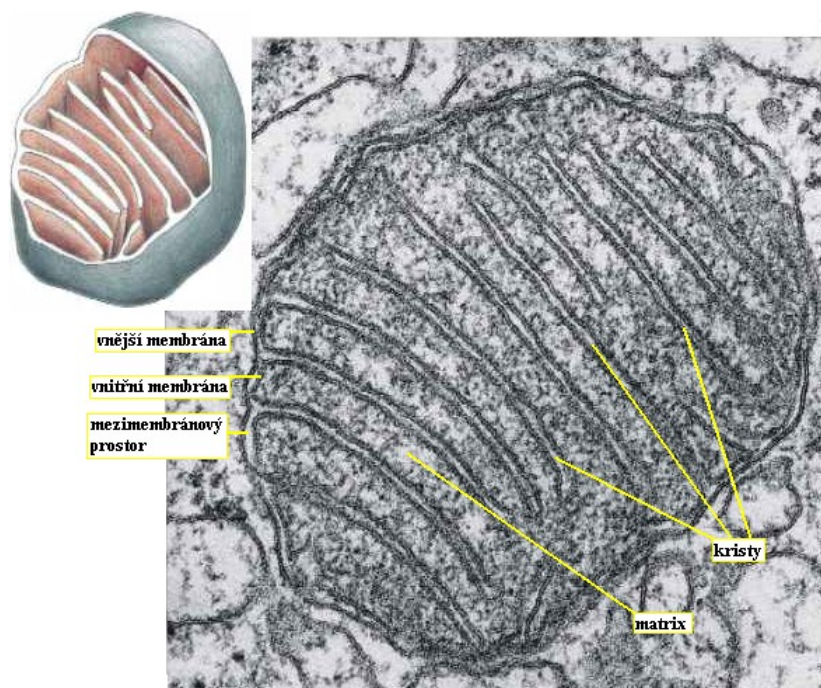
Pro pochopení významu a funkce uncoupling proteinů je nejprve nutné znát strukturu mitochondrií a zejména jejich funkci, tj. buněčnou respiraci.

Mitochondrie, objevené v 19. století, jsou semiautonomní cytoplazmatické organely všech eukaryotických buněk, neboť obsahují vlastní DNA a kompletní proteosyntetický aparát. Jejich strukturu detailněji popsali George Paladeus a Fritjof Sjöstrand na základě studií pomocí elektronové mikroskopie (Voet D. a Voet J.G., 1995). Počet, velikost i tvar mitochondrií se mění v závislosti na aktuálním stavu buňky (Bereiter-Hahn, 1990). Obvykle se ale vyobrazují jako podlouhlé válečky o průměru 0,5 až 1 μm a délce 1 až 2 μm . Množství mitochondrií a jejich členitost závisí na metabolické aktivitě a oxidační kapacitě buňky (Houštěk, 2001). Umístění mitochondrií v cytoplazmě buněk se mění na základě jejich funkce. Buď jsou lokalizovány rovnoměrně, nebo jsou nahromaděny v jednom místě buňky, kde je vysoká spotřeba ATP. Například ve svalových buňkách a kardiocytech jsou mitochondrie umístěny mezi myofibrilami, v případě spermií jsou těsně ovinuty okolo bičíku, ale jejich počet je velmi malý (Barnová et al., 1990; Alberts et al., 1998). Nové mitochondrie nevznikají *de novo*, ale vytváří se růstem následovaným přehrádečným dělením. To je důkazem jejich bakteriálního původu, neboť mitochondrie vznikly endosymbiózou aerobní bakterie s primitivní anaerobní eukaryotickou buňkou před více než miliardou let (Alberts et al., 1998).

Všechny mitochondrie mají vnější a vnitřní membránu, které se liší nejenom složením, ale především funkcí. Tyto membrány vytváří v mitochondrii dva oddělené prostory, vnitřní membrána ohraničuje vnitřní prostor tzv. matrix a mezi vnitřní a vnější membránou je úzký mezimembránový prostor (Barnová et al., 1990; Voet D. a Voet J.G., 1995; Alberts et al., 1998; Houštěk, 2001).

Vnější membrána ohraničuje organelu od cytoplazmy a je v úzkém kontaktu s endoplazmatickým retikulem. Membrána obsahuje transportní protein, nazývaný porin, který umožňuje vytváření kanálů, které jsou propustné pro molekuly do velikosti 5 kDa. To znamená, že vnější membrána není propustná pro bílkoviny, které se jsou transportovány z cytoplazmy do mezimembránového prostoru pomocí přenašečového aparátu, tzv. TOM (translokáza vnější membrány) komplexu. Ve vnější membráně se

dále nachází enzymy pro syntézu lipidů a fosfolipidů, enzymy aktivace a elongace mastných kyselin, ale také aminooxidáza (Barnová et al., 1990; Alberts et al., 1998; Houštěk, 2001).



Obr. č. 1: Struktura mitochondrií. *Převzato z Alberts et al., 1998.*

Mezimembránový prostor obsahuje některé rozpustné proteiny, kinázy (např. adenylátkináza, nukleosiddifosfátkináza), ale zejména cytochrom *c*. Vnitřní mitochondriální membrána je invaginována, tj. vchlípena do vnitřního prostoru matrix a tvoří tzv. kristy, díky kterým je povrch membrány značně zvětšen. Počet a tvar krist závisí na typu a funkci buňky a také na její metabolické aktivitě. Tato membrána je zásadní pro funkčnost mitochondrie, je tvořena speciální fosfolipidovou dvouvrstvou a obsahuje specifický fosfolipid kardiolipin. Membrána je proto propustná pouze pro vodu a menší neionizované molekuly (zejména plyny jako O_2 , CO_2). Pro přenos iontů, nukleotidů, substrátů, metabolitů, prekurzorů mitochondriálních proteinů (ATP, ADP, pyruvát, Ca^{2+} , fosfát apod.) je tedy nutná přítomnost selektivních transportních proteinů, tzv. TIM komplex (translokáza vnitřní membrány), zajišťujících komunikaci matrix a cytoplazmy. Ve vnitřní membráně jsou také lokalizovány enzymové komplexy respiračního řetězce (NADH-dehydrogenáza, sukcinátdehydrogenáza, bc1 komplex, cytochrom *c*-oxidáza), mitochondriální ATPáza a specifické H^+ transportní proteiny (uncoupling proteiny) (Barnová et al., 1990; Voet D. a Voet J.G., 1995; Alberts et al., 1998; Houštěk, 2001).

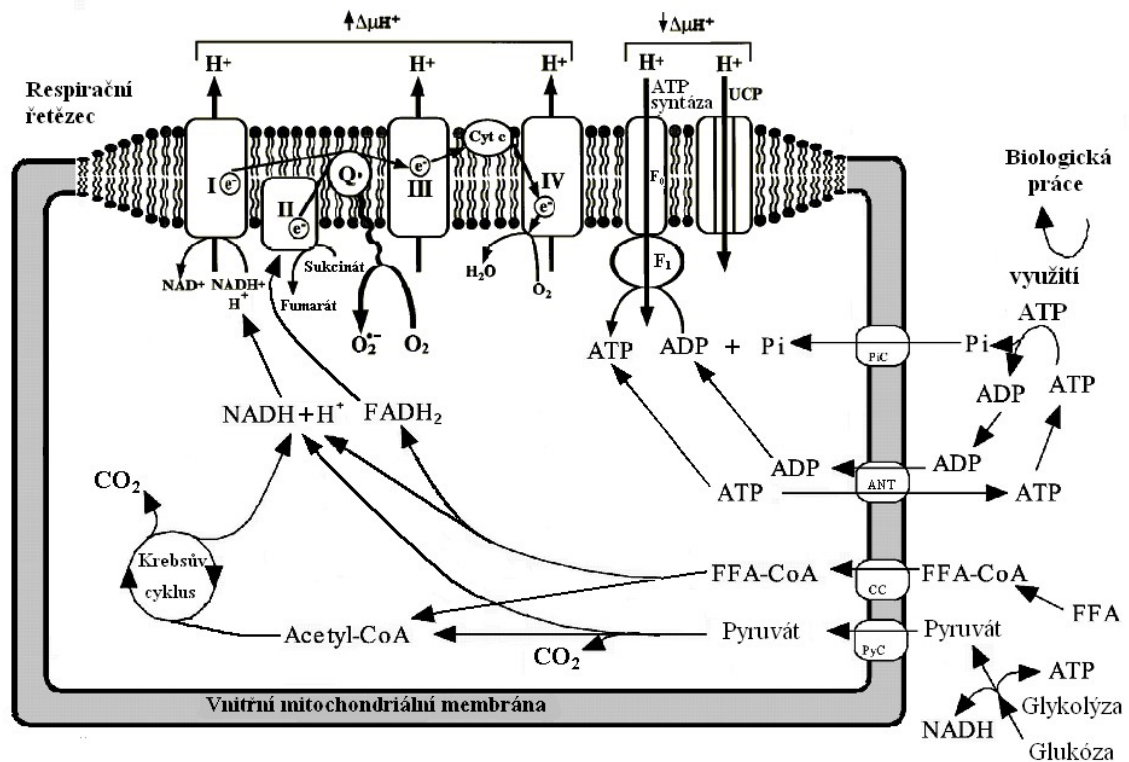
Vnitřní prostor mitochondrie, matrix, je relativně hustý, neboť obsahuje méně než 50 % vody a více než dvě třetiny mitochondriálních proteinů a enzymů. Patří k nim enzymy citrátového cyklu, β -oxidace mastných kyselin, některé enzymy syntézy porfyrinů a v hepatocytech ještě enzymy pro syntézu močoviny. Matrix může také sloužit jako zásobárna vápníku (Barnová et al., 1990; Houštěk, 2001). Mitochondrie mají v matrix uloženu mimojadernou genetickou informaci, cirkulární mitochondriální DNA (mtDNA), která byla objevena v roce 1963. Lidská dvouřetězcová mtDNA obsahuje 16569 párů bazí a její sekvence byla určena v roce 1981. Tato DNA ale neobsahuje introny a nese pouze minimální množství genetické informace (37 genů) – 22 genů kóduje tRNA, 2 ribozomální RNA (12S a 16S) a pouhých 13 genů kóduje proteiny, které jsou nejenom strukturně, ale i funkčně odlišné od proteinů kódovaných jadernou DNA (Leonard a Schapira, 2000; Schon, 2000; Gao et al., 2008). Přímou v mitochondriích tak vznikají proteiny podjednotek komplexů respiračního řetězce a podjednotek ATPázy, proto jsou v matrix přítomny i ribozomy, aminokyseliny, tRNA a mRNA potřebné k proteosyntéze. Ostatní bílkoviny mitochondrií jsou ale syntetizovány v cytoplasmě a do mitochondrie jsou přenášeny pomocí TOM a TIM komplexů (Barnová et al., 1990; Houštěk, 2001).

Nezastupitelnou úlohou mitochondrií je buněčná respirace. Ta se skládá ze dvou navazujících dějů, a to dýchacího řetězce a oxidační fosforylace, která vede ke vzniku až 95 % buněčného ATP (Houštěk; 2001). Dýchací řetězec navazuje na citrátový (Krebsův) cyklus, probíhající také v matrix mitochondrií, který je konečnou metabolickou drahou pro oxidaci sacharidů, lipidů a proteinů, neboť jsou vesměs metabolizovány na acetyl-CoA nebo jiné meziprodukty tohoto cyklu. Ten je zahájen reakcí oxalacetátu a acetyl-CoA za katalýzy enzymem citrátsyntázou za vzniku citrátu, který je ve sledu několika následujících reakcí regenerován zpět na oxalacetát. V průběhu cyklu tak dochází ke vzniku dvou molekul CO_2 , tří molekul $\text{NADH} + \text{H}^+$ a jedné molekuly FADH_2 , které nesou redukční ekvivalenty. Ty poté vstupují do dýchacího řetězce.

Dýchací řetězec savců je tvořen čtyřmi multipodjednotkovými enzymovými komplexy (oxidoreduktázami), a to NADH-dehydrogenázou (komplex I), sukcinát-dehydrogenázou (komplex II), bc1 komplexem (komplex III) a cytochrom *c*-oxidázou (komplex IV), které jsou ukotveny ve vnitřní mitochondriální membráně. Vstup většiny redukčních ekvivalentů do respiračního řetězce probíhá prostřednictvím komplexu I a $\text{NADH} + \text{H}^+$ (resp. přeměny $\text{NADH} + \text{H}^+$ na NAD^+). Komplex I uvolňuje protony

vodíku přeneše do mezimembránového prostoru a elektrony přeneše za účasti flavinmononukleotidu (FMN) a šesti až sedmi Fe-S proteinů na mobilní rozpustný přenašeč ubichinon nebo-li koenzym Q (CoQ). Ten je zároveň akceptorem elektronů z komplexu II – sukcinátdehydrogenázy, kam jsou elektrony předávány prostřednictvím FADH₂ (resp. přeměny FADH₂ na FAD) vzniklého při oxidaci sukcinátu na fumarát během citrátového cyklu. CoQ může vázat jeden proton H⁺ na každý přijímaný elektron a celkově tedy může přenášet až dva elektrony jako součást vodíkového atomu, kdy při přijetí dvou vodíků je CoQ redukován až na ubichinol nebo-li hydrochinon (NADH + H⁺ nebo FADH₂ + CoQ → NAD⁺ nebo FAD + CoQH₂). Redukovaný CoQH₂ předává vodíky komplexu III dýchacího řetězce. V rámci tohoto komplexu jsou elektrony následně předány na Fe-S protein, a poté na cytochrom *c*₁, který přeneše elektrony na cytochrom *c* a protony jsou transportovány do mezimembránového prostoru. Cytochrom *c* je lokalizován na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány a díky volné vazbě se může střídavě vázat na cytochrom *c*₁ komplexu III a cytochrom *c*-oxidázu (komplex IV) a fungovat tak jako přenašeč elektronů. Poslední komplex dýchacího řetězce se skládá z několika podjednotek, kdy cytochrom *a* přijímá dva elektrony od cytochromu *c* a přenáší je na cytochrom *a*₃, který pravděpodobně katalyzuje přenos elektronů na kyslík. Kyslík, který difunduje do matrix mitochondrií z cytoplazmy, se váže k tomuto komplexu a je redukován na vodu (Barnová et al., 1990; Voet D. a Voet J.G., 1995; Alberts et al., 1998).

Celý tento proces transportu elektronů je umožněn funkčním seřazením jednotlivých komponent dle redoxních potenciálů, tj. od elektronegativních komponent (-0,32 V pro NADH + H⁺/NAD⁺) k elektropozitivnějším (0,82 V pro cytochrom *a*₃/O₂). Energie jednotlivých oxidoredukčních reakcí probíhajících na komplexech I, III a IV je využita k transportu protonů vodíku proti koncentračnímu spádu z matrix do mezimembránového prostoru. Tím se vytváří na membráně protonový gradient, který je následně využit k syntéze ATP. Kromě uvedených komplexů je další složkou, která napomáhá vytvářet protonový gradient, také koenzym Q (Voet D., Voet J.G., 1995; Barnová et al., 1990; Alberts et al., 1998).



Obr. č. 2: Mitochondriální energetický metabolismus. Napojení dýchacího řetězce s oxidační fosforylací, event. uncoupling proteiny (UCP) na předchozí metabolické dráhy. FFA, volné mastné kyseliny; PiC fosfátový přenašeč; ANT, adeninnukleotid-translokáza; CC, přenašeč karnitinu; PyC, přenašeč pyruvátu. Převzato a upraveno dle Boss et al., 2000 a Lowell a Bachman, 2003.

Syntéza ATP z ADP a Pi probíhá v mitochondriích v procesu nazývaném oxidační fosforylace a je katalyzována ATP-syntázou (kompleksem V), která je oddělena od dýchacího řetězce. Pro syntézu ATP je tak nutné, aby oba tyto procesy byly těsně spřaženy. Proces spřažení (coupling) je od r. 1961 vysvětlován zejména tzv. Mitchellovou teorií, kdy volná energie transportu elektronů je uchována ve formě vzniklého protonového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně, jehož elektrochemický potenciál je následně využit ATP-syntázou translokující protony k syntéze ATP. Podmínkou tohoto procesu je neporušenost vnitřní mitochondriální membrány a její nepropustnost pro některé ionty (H⁺, OH⁻, K⁺, Cl⁻). ATP-syntáza je enzymový komplex tvořený z hlavice F₁ (katalytické složky), která je umístěna na vnitřní straně vnitřní mitochondriální membrány a je tvořena podjednotkami 5 typů, α₃β₃γδε, a F₀ podjednotky umístěné transmembránově. Ta plní funkci protonového kanálu pro transport H⁺ zpět do matrix po gradientu svého elektrochemického

potenciálu, kdy je tento tok využit k pohonu energeticky nepříznivé reakce ADP s P_i za vzniku ATP (Barnová et al., 1990; Voet D. a Voet J.G., 1995; Alberts et al., 1998).

V klidovém stavu, kdy se vytváří ATP minimálně, se tvorba protonového gradientu od určitého stupně zpomaluje až zastavuje, čímž dochází ke zpomalení transportu elektronů. Naopak v případě, kdy jsou elektrony transportovány zpět do matrix, tak že obcházejí dráhu ATP syntézy, dochází k inhibici této ATP syntézy a disipaci energie vzniklého elektrochemického potenciálu protonů ve formě tepla. Tento jev se nazývá odpřažení oxidační fosforylace, tzv. uncoupling (Voet D. a Voet J.G., 1995; Ježek et al., 2004). Za fyziologických podmínek není veškerá energie protonového gradientu využita ATP syntázou, ale část energie je spotřebovávána prostřednictvím tzv. mírného, částečného odpřažení („mild uncoupling“). Tento proces představuje okolo 20 % bazálního metabolismu a jeho fyziologická funkce spočívá v termogenezi, zejména v hnědé tukové tkáni novorozenců nebo hibernujících zvířat, v útlumu produkce a akumulace reaktivních kyslíkových radikálů a v regulaci energetického metabolismu, tělesné hmotnosti (Skulachev, 1998; Ricquier a Bouillaud, 2000 A; Ricquier a Bouillaud, 2000 B; Ježek, 2002; Nübel a Ricquier 2006; Echtaý, 2007). Uncoupling umožňuje kontrolovat poměr $NAD^+/NADH + H^+$ a regulovat tak metabolické dráhy (ketogenezi, lipogenezi a syntézu aminokyselin), které jsou závislé na hladině těchto koenzymů (Ricquier a Bouillaud, 2000 B), a zároveň zvyšuje rychlost oxidace substrátů (Brauner et al., 2002). Uncoupling v mitochondriích tedy není pouhá nedokonalost, ale slouží na pokrytí naléhavých nároků organismu.

V mitochondriích existují dva druhy odpřažení: prvním je bazální odpřažení, které není akutně regulováno a je přítomno ve všech mitochondriích. Jedná se o pasivní transport protonů do matrix membránovými otvory, štěrbinami nebo protein/lipidovým rozhraním membrány. Druhým je indukovatelné proteinové spojení pro přesun protonů, které je těsně regulovatelné a přítomné v určitých buněčných typech (Lanni et al., 2003; Ježek et al., 2004). Průnik protonů přes vnitřní mitochondriální membránu po směru elektrochemického gradientu může být také způsoben toxickými lipofilními ionofory jako 2,4-dinitrofenol (DNP), karbonylkyanid-*p*-trifluoromethoxyfenylhydrazon (FCCP) nebo karbonyl-kyanid-*m*-chlorofenylhydrazon (CCCp), některými endogenními faktory (vápenaté ionty, neesterifikované mastné kyseliny, tyroidní hormony) nebo různými mitochondriálními přenašečovými proteiny jako například adeninnukleotidtranslokázou a zejména uncoupling proteiny (UCPs, odpřahující proteiny), které tak mohou regulovat

membránový potenciál (Skulachev, 1998; Ricquier a Bouillaud, 2000 A; Ježek et al., 2004; Nübel a Ricquier, 2006; Echtay, 2007).

2.2. Uncoupling proteiny

2.2.1. Historie uncoupling proteinů a jejich charakteristika

Již v roce 1939 ruští biochemici Belitser a Tsibaková představili „uncoupling“, neboť zjistili, že přidavek arzeničnanu ke kosternímu svalstvu myši vyvolává respiraci bez tvorby ATP. Arzeničnany jsou tedy chronologicky prvními popsányi odpřahovači dýchacího řetězce a oxidační fosforylace. Odpráhující efekt byl v roce 1948 popsán Lomisem a Lipmannem u 2,4-*p*-dinitrofenolu (DNP) a v roce 1956 Pressmanem a Lardym u neesterifikovaných mastných kyselin. Až v roce 1961 vysvětlil tento efekt P. Mitchell na základě předpokladu, že DNP zvyšuje protonovou vodivost membrány a odvádí tak gradient protonů, vytvořený během respirace (Skulachev, 1998). Objev uncoupling proteinu, resp. uncoupling proteinu 1, byl možný jen díky studiím mechanismu termogeneze v hnědé tukové tkáni (BAT), které probíhaly v šedesátých letech minulého století. V roce 1967 R. Smith, O. Lindberg a jejich spolupracovníci nezávisle na sobě pozorovali v mitochondriích izolovaných z BAT odpřažení fosforylace od respirace. Další vědci v následujících letech demonstrovali, že odpřažení v mitochondriích BAT je aktivováno mastnými kyselinami a inhibováno purinovými nukleotidy (GTP, GDP, ATP nebo ADP). Všechny tyto objevy tak nasvědčovaly existenci regulovatelného odpřahovače ve vnitřní mitochondriální membráně (Ricquier a Bouillaud, 2000 B; Mikulová a Hainer, 2001).

Největší průlom v objevu uncoupling proteinů představují nálezy D. G. Nichollse a spolupracovníků. Ti nejprve zjistili vysokou protonovou vodivost u mitochondrií BAT a následně pomocí fotoafinitního značení identifikovali v roce 1976 dva hlavní radioaktivní pásy. Jeden o molekulové hmotnosti 30 kDa představoval přibližně 6 % ze všech proteinů vnitřní mitochondriální membrány a byl identifikován jako karboxyatraktylát vázající komponenta adeninnukleotidtranslokázy. V rámci druhého pásu byl identifikován 32 kDa protein se zastoupením 10 %, který byl označen jako regulační místo ztráty energie pomocí iontového uniportu. Množství tohoto proteinu v BAT mitochondriích morčat navíc korelovalo se stupněm termogenní adaptace těchto

zvířat (Heaton et al., 1978; Ricquier a Bouillaud, 2000 B). V roce 1976 také Ricquier a Kader popsali mitochondriální protein o stejné molekulové hmotnosti, ale neznámé funkci, jehož koncentrace se významně zvyšovala v mitochondriích hnědé tukové tkáně potkanů po adaptaci na chlad (Heaton et al., 1978; Nicholls a Rial, 1999). První purifikace tohoto proteinu byla provedena v roce 1982 a jeho DNA byla klonována v roce 1984 (Ricquier a Bouillaud, 2000 A). Tento protein byl pojmenován jako thermogenin.

Toto označení platilo až do roku 1997, kdy byl Fleuryem a spol. (1997) a Gimenezem a spol. (1997) objeven UCP homolog exprimovaný v několika tkáních myši a lidí v různých hladinách. Tento protein byl nazván uncoupling protein 2 (UCP2) a thermogenin byl nově označen jako uncoupling protein 1 (UCP1) (Skulachev, 1999; Boss et al., 2000; Ricquier a Bouillaud, 2000 B; Schrauwen a Hesselink, 2002). O několik měsíců později, na konci roku 1997 byl popsán Bossem a spol. (1997 B) třetí uncoupling protein (UCP3). Ve stejném roce klonoval Laloï a spol. (1997) také první rostlinný uncoupling protein přítomný v bramborech *Solanum tuberosum* (StUCP). V následujícím roce 1998 byl identifikován Sanchisem a spol. (1998) další homolog, který je převážně exprimován v mozkové tkáni, tzv. mozkový mitochondriální přenašečový protein 1 (brain mitochondrial carrier protein 1, BMCP1), nebo-li UCP5. Nakonec Mao a spol. v roce 1999 popsali další mitochondriální přenašeč s odpráhuječnou aktivitou v savčích mozkových buňkách, UCP4 (Mao et al., 1999). Doposud bylo tedy popsáno pět homologních uncoupling proteinů (UCP1 až UCP5) (Erlanson-Albertsson, 2002).

Jednotlivé uncoupling proteiny se mezi sebou liší například v molekulové hmotnosti, počtu aminokyselin, distribuci a vzájemné procentuální identitě aminokyselinových sekvencí mezi UCP1 až UCP3. Rozdíly proto názorně shrnuje tabulka č. 1, včetně odlišností mezi UCP lidí, myši a potkanů UCP. Procentuální shoda sekvencí uncoupling proteinů mezi lidmi a hlodavci (myši, potkani) je u UCP1 79 %, v případě UCP3 85 % a nejvyšší podobnost je u UCP2, a to 95 % (Bouillaud et al., 2001; Mattiasson a Sullivan, 2006), mezi savčí, resp. lidskou a rybí sekvencí UCP2 je sekvencí aminokyselinová podobnost okolo 82 % (Stuart et al., 2001; Saleh et al., 2002). Sekvenční identita mezi UCP4, BMCP1 a UCP1 až UCP3 je mezi 29 až 34 %, resp. 34 až 39 % (Boss et al., 2000). UCP4 a BMCP1 jsou tedy nejvíce odlišné, a to i po stránce fylogenetické (Ledesma et al., 2002; Coulibaly et al., 2006).

Tab. č. 1: Charakteristika uncoupling proteinů 1 až 3 (UCP1 až UCP3).

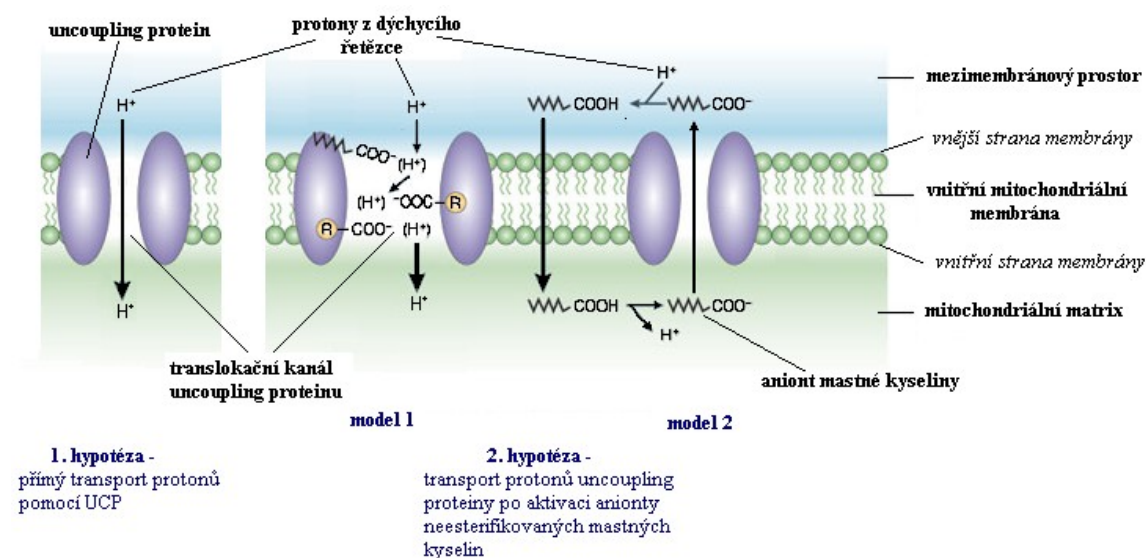
Uncoupling protein (UCP)	Molekulová hmotnost (kDa)	Počet aminokyselin	Distribuce	Procentuální identita	
				s UCP1	s UCP2
mUCP1	33,117	306	zejména	100	56
rUCP1	33,080	306	hnědá tuková	---	57
hUCP1	32,873	306	tkáň	---	57
mUCP2	33,342	308	všechny tkáně	59	100
rUCP2	33,245	308		57	---
hUCP2	33,098	308		59	---
mUCP3	33,779	307	kosterní	54	73
rUCP3	33,384	307	svalstvo,	54	72
hUCP3 _L	34,084	312	srdce, hnědá	57	72
hUCP3 _S	29,651	275	tuková tkáň		

Pozn.: m - myši, r - potkaní, h - lidský uncoupling protein; převzato a upraveno dle Ricquier a Bouillaud, 2000 B a Brauner et al., 2002.

Funkce a vliv těchto proteinů vnitřní mitochondriální membrány na buněčný a celkový metabolismus závisí zejména na typu tkáně, ve které exprimují v různé míře. UCP1 je za fyziologických podmínek přítomný zejména v adipocytech hnědé tukové tkáně, kde se podílí na termogenezi, UCP2 se nachází v mnoha typech buněk a tkání (např. v makrofázích, pankreatických β -buňkách, fetálních hepatocytech apod.). UCP3 exprimuje v hnědém tuku a kosterním svalstvu, kde hraje roli při oxidaci mastných kyselin, uplatňuje se v inzulínové citlivosti buněk a antioxidační ochraně (Brauner et al., 2002; Mattson a Liu, 2003; Wolkow a Iser, 2006). Lidský UCP3 existuje ve dvou formách – dlouhé L formě, která představuje celou délku proteinu, a krátké S formě, které na C konci chybí 37 aminokyselin (Solanes et al., 1997; Porter, 2001). UCP4 je exprimován výhradně v centrálním nervovém systému a UCP5 je exprimován hlavně v mozku a v 7- až 30-násobně nižších hladinách i v jiných tkáních, jejich funkce je stále diskutována, ale pravděpodobně přispívají také k antioxidační ochraně buněk (Boss et al., 2000; Wolkow a Iser, 2006).

Mechanismus odpražení, redukce protonového gradientu, pomocí uncoupling proteinů není kompletně objasněn, ale je vysvětlován na základě dvou hypotéz (obr. č. 3). První hypotéza předpokládá, že UCP transportují protony přímo (Borecký et al.,

2001; Mattiasson a Sullivan, 2006). Druhá hypotéza je založena na aktivaci transportu protonů anionty neesterifikovaných mastných kyselin a je vysvětlována na základě dvou modelů (Boss et al., 2000; Mattiasson a Sullivan, 2006). Podle prvního modelu, popsaného Klingenbergem a spol., volné mastné kyseliny (FFA) fungují jako pufrovací kofaktory poskytující proton přímo UCP proteinu, resp. jeho transportnímu kanálu, který přemísťuje proton zpět do matrix. Předání H^+ probíhá následujícím způsobem: volné protony se naváží na karboxylové skupiny mastných kyselin, které se tak stanou elektroneutrální. Ty následně předávají navázaný proton uncoupling proteinu buď přímou interakcí, nebo za pomoci koenzymu Q, kdy FFA v interakci s koenzymem předávají H^+ uncoupling proteinu. Ten poté transportuje protony skrz vnitřní mitochondriální membránu a anionty mastných kyselin se vrací zpět do mezimembránového prostoru, tím se celý proces může znovu opakovat (Boss et al., 2000; Ricquier a Bouillaud, 2000 B; Klingenberg a Echtaý, 2001; Mattiasson a Sullivan, 2006).



Obr. č. 3: Mechanismus transportu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu pomocí uncoupling proteinů. *Převzato a upraveno dle Krauss et al., 2005.*

Druhý model, navržený Garlidem a spol. (1998) a někdy nazývaný jako „fatty acid protonophore model“, naznačuje, že UCP spíše transportují anionty mastných kyselin než protony. Odpřažení respirace tedy nastává prostřednictvím cirkulace mastných kyselin, tzv. překlápění („flip-flop“) skrz vnitřní mitochondriální membránu. Během tohoto děje se volné protony naváží na karboxylové skupiny mastných kyselin, které jako elektroneutrální projdou skrz membránu a v matrix uvolní proton. Monovalentní,

negativně nabitě FFA jsou poté uncoupling proteiny transportovány zpět z matrix, kde celý koloběh může opět začít. Transport aniontů FFA je poháněn pomocí vnitřního negativního membránového potenciálu mitochondrií (Garlid et al., 1998; Boss et al., 2000; Ricquier a Bouillaud, 2000 B; Mattiasson a Sullivan, 2006).

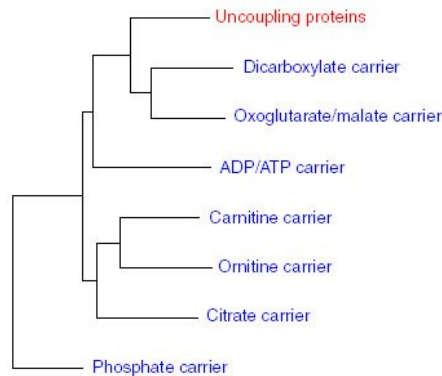
Do dnešní doby není však známo, který ze dvou modelů je správnější, a to i přes mnoho argumentů pro a proti (Garlid et al., 1998; Klingenberg a Echtaý, 2001). Například u druhého modelu je silným argumentem proti pozorování, že deriváty mastných kyselin (ω -karboxylpalmitát, mastné kyseliny substituované fenylem apod.) neschopné cirkulace přes mitochondriální membránu aktivují protonový transport pomocí UCP1. Opačným argumentem je skutečnost, že alkylsulfonáty, jako silné kyseliny neschopné cirkulace přes lipidovou dvojvrstvu, jsou transportovány pomocí UCP1 (Boss et al., 2000; Mattiasson a Sullivan, 2006). Transport protonů pomocí uncoupling proteinů může být do značné míry ovlivňován, neboť mastné kyseliny ho aktivují a naopak purinové nukleotidy hrají roli inhibitorů (Boss et al., 2000; Ricquier a Bouillaud, 2000 B).

2.2.2. Struktura UCP proteinů a genů

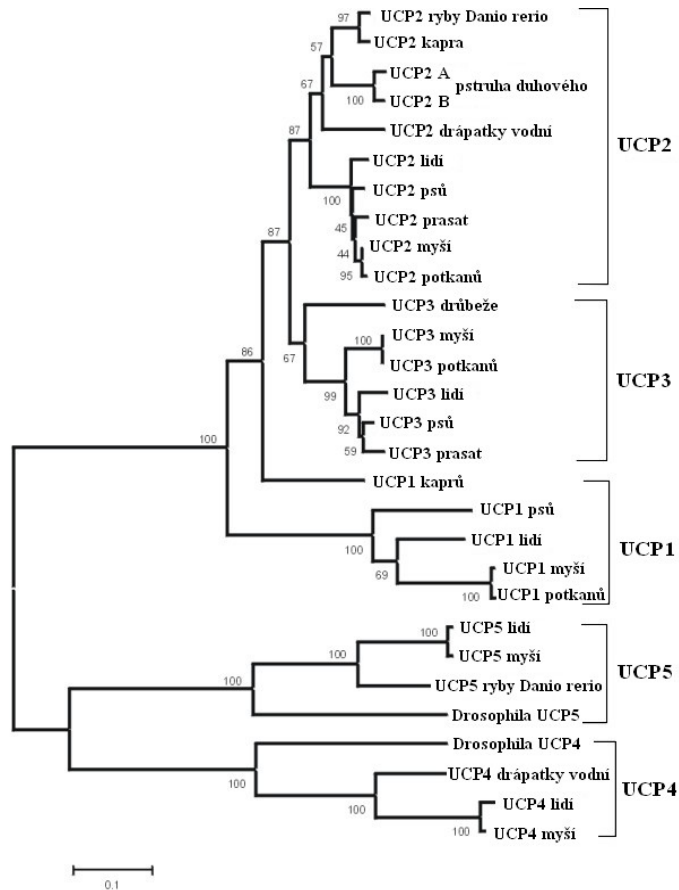
UCP patří do velké superrodiny metabolických přenašečů vnitřní mitochondriální membrány (tzv. Mitochondrial Anion Carrier Proteins, MACP, obr. č. 4), která obsahuje okolo 17 skupin nebo podrodin jako např. ADP/ATP přenašeč, přenašeč karnitinu, fosfátu, citrátu, ornitinu, 2-oxoglutarát/malátový přenašeč a další (Boss et al., 2000). Jedná se o proteiny dlouhé okolo 300 aminokyselin, jejichž molekulová hmotnost je ve velmi úzkém rozmezí mezi 28 až 34 kDa. Strukturálně si jsou proteiny velmi podobné, neboť obsahují tři sekvenční repetyce (domény), z nichž každá obsahuje přibližně 100 aminokyselin (Borecký et al., 2001; Ježek P., Ježek J., 2003). Mitochondriální přenašeče se pravděpodobně vyvinuly z pravěkých proteinů obsahujících dva transmembránové helixy, které byly poté ztrojnásobeny. Funkční přenašečové proteiny jsou homodimery, to znamená, že obsahují celkem 12 těchto helixů (Boss et al., 2000; Ledesma et al., 2002).

Fylogenetická analýza (obr. č. 5) ukazuje, že savčí a rostlinné UCP se soustředí do dvou skupin, první se skládá z UCP1, UCP2, UCP3 a rostlinných UCP, zatímco UCP4 a BMCP1 tvoří rozdílnou skupinu. Nejmenší fylogenetický rozdíl je mezi UCP2 a UCP3,

UCP1 je více vzdálen a vše nasvědčuje tomu, že původní UCP gen je blíže (více podobný) k UCP2/UCP3 než UCP1 (Fleury a Sanchis, 1999; Borecký et al., 2001).



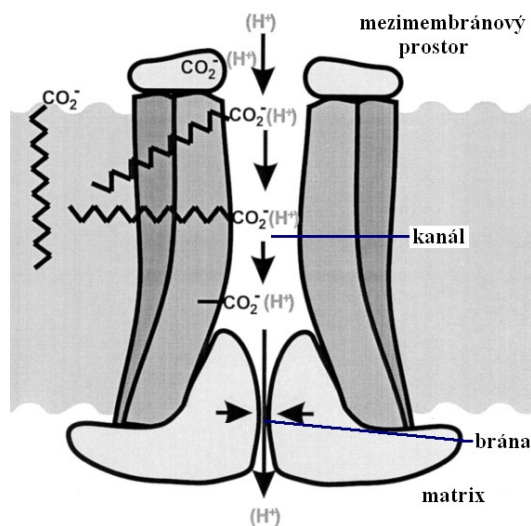
Obr. č. 4: Fylogenetický strom typických představitelů superrodiny mitochondriálních přenašečů včetně UCP. *Převzato z Ledesma et al., 2002.*



Obr. č. 5: Evoluční strom příbuznosti uncoupling proteinů. *Převzato z Coulibaly et al., 2006.*

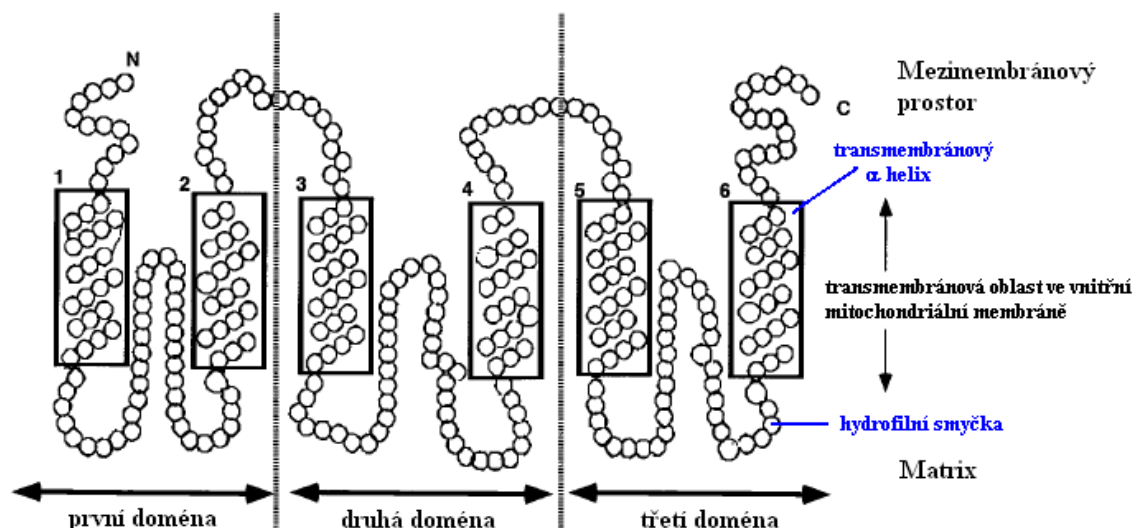
UCP mají hlavní vlastnosti popisované u přenašečů včetně vysoké specifity pro přenášené substráty a malé možnosti přeměny. Přesto delece devíti aminokyselin (261

až 269) na konci třetí matrixové smyčky v UCP1 vede k uspořádání podobnému póru/kanálu, kterým mohou pronikat molekuly až do 1000 Da (Ricquier a Bouillaud, 2000 B; Argyropoulos a Harper, 2002; Ledesma et al., 2002). To ukazuje na skutečnost, že UCP proteiny mají dva transportní režimy – aktivitu substrátově specifického přenašeče a chování méně specifického kanálu. Tato vlastnost je vyjádřena funkční a strukturální organizací ve dvou oblastech – v kanálové a přenašečové oblasti. U UCP1 bylo zjištěno, že matrixové smyčky přispívají k tvorbě úzké brány, která je rozhodujícím činitelem kontroly transportní aktivity. Směrem do mezimembránového prostoru se vyskytuje široký hydrofilní pór/kanál, který je tvořen transmembránovými α -helixy (Fleury a Sanchis, 1999; Klingenberg, 1999; Ledesma et al., 2002).



Obr. č. 6: Uspořádání dvou transportních režimů uncoupling proteinů. *Převzato a upraveno z Klingenberg, 1999.*

Strukturu uncoupling proteinů je možné rozdělit do tří podobných domén (obr. č. 7), které vždy obsahují okolo 100 aminokyselin a dva transmembránové helixy. Ty jsou od sebe odděleny na matrixové straně vnitřní mitochondriální membrány v průměru 40 aminokyselinami s vysoce hydrofilní sekvencí, tzv. hydrofilní (polární) matrixovou smyčkou, a na straně mezimembránového prostoru smyčkou vytvořenou přibližně z 18 aminokyselin (Klingenberg, 1999). Polypeptidový řetězec tedy 6× kříží mitochondriální membránu a dusíkatý i uhlíkatý konec aminokyselinové sekvence je vždy orientován do mezimembránového prostoru. Funkční uncoupling protein je vždy ve formě homodimeru tvořeného dvěma kovalentně vázanými identickými podjednotkami (Ledesma et al., 2002).



Obr. č. 7: Strukturální uspořádání monomeru uncoupling proteinů ve vnitřní mitochondriální membráně. Každá z domén obsahuje přibližně 100 aminokyselin, jednotlivé transmembránové helixy jsou znázorněny v rámečku označeném číslem. N – dusíkatý konec, C – uhlíkatý konec aminokyselinové sekvence. *Převzato a upraveno dle Fleury a Sanchis, 1999 a Krauss et al., 2005.*

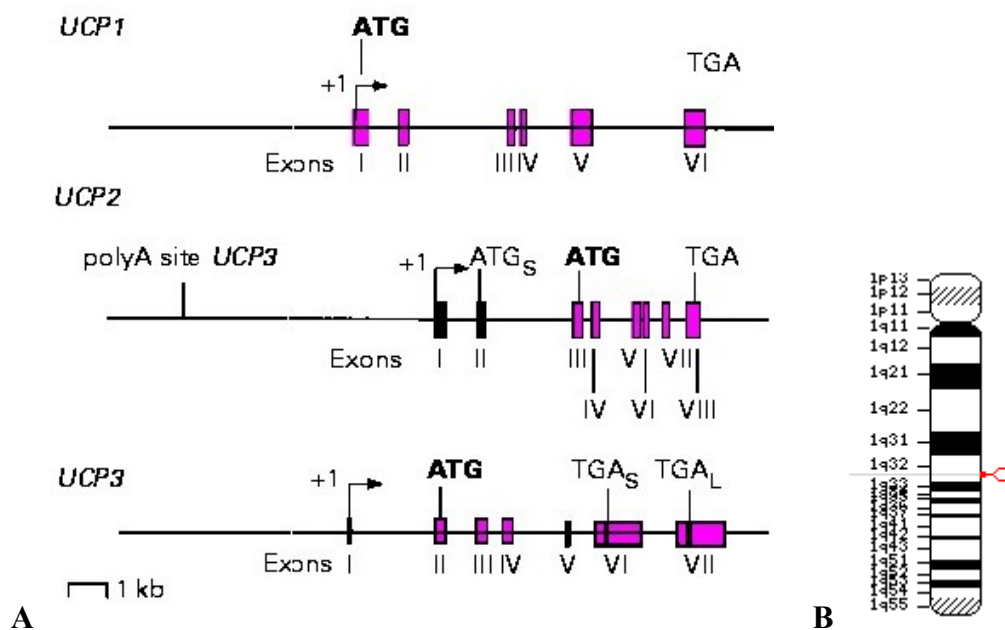
Všechny mitochondriální přenašeče obsahují fylogeneticky vysoce konzervovaný motiv tzv. „signaturu proteinů přenášejících energii“ často nazývaný jako PAXX + X + motiv (P-x-[DE]-x-[LIVAT]-[RK]-x-[LRH]-[LIVMFY]-[QGAIVM] nebo MACP signatura) (Klingenberg, 1999; Borecký et al., 2001; Ledesma et al., 2002). U UCP proteinů se vyskytují celkem 3 motivy, tj. v každé sekvenční repetici (doméně) se nachází jedna MACP signatura (Borecký et al., 2001), která pravděpodobně předurčuje vytváření matrixového segmentu (Ježek P. a Ježek J., 2003). Ježek a spol. identifikovali uncoupling proteinům společné sekvenční motivy aminokyselin, tzv. UCP signatury, ve druhém matrixovém segmentu (s výjimkou BMCP1) a v prvním, druhém, čtvrtém a šestém α -helixu, které se ale nevyskytují u jiných přenašečů MACP rodiny. V pátém helixu se ještě vyskytuje UCP-specifická dvojice aminokyselin, cystein nebo threonin spolu s histidinem. Šestý helix je téměř kompletně specifický pro UCPs a obsahuje předpokládanou doménu pro vazbu purinových nukleotidů (Ježek a Urbánková, 2000). V aminokyselinové sekvenci je také několik rozhodujících konzervativních reziduí, které jsou asociovány se specifickými funkcemi UCP. Mezi tato rezidua patří následující aminokyseliny – kyselina asparagová na pozici 27 (D27) v prvním helixu, arginin (R91) ve druhém helixu, glutamová kyselina (E190) a histidin (H214) těsně na začátku pátého helixu (Klingenberg, 1999). Mutageneze prvního helixu a druhého

His145 (Jabůrek et al., 1999). Tyto rozdíly podporovaly myšlenku, že UCP2 a UCP3 nemají protonovou transportní aktivitu nebo že je tato aktivita redukována, eventuelně proteiny využívají jiný mechanismus protonového transportu závislého na mastných kyselinách. Zhang a spol. ale zjistili, že tyto histidiny nejsou pro uncouplingovou aktivitu UCP1 nezbytné, proto ani u UCP2 a UCP3 nehrají roli (Boss et al., 2000; Klingenberg a Echtay, 2001). Řada aminokyselin v jednotlivých helixech (arginin v pozici 83, 91, 182 a 276, glutamová kyselina v pozici 190 a histidin v pozici 214 u lidí, u potkanů jsou tyto aminokyseliny posunuty o jednu pozici dále) je důležitá pro regulaci odpřahující aktivity UCP proteinů. Například mutace v argininech R83I, R182Q a R276Q vede ke ztrátě možnosti vazby purinových nukleotidů a v argininu v pozici 91 (R91T) ke snížení afinity jejich vazby v závislosti na pH, aniž by byl ovlivněn transport protonů. Mutace v histidinu v pozici 214 (H214N) snižuje v závislosti na pH pouze vazbu nukleotidtrifosfátu (NTP) k UCP proteinům, ale nikoliv nukleotiddifosfátu (NDP) (Boss et al., 2000; Klingenberg a Echtay, 2001; Porter, 2001). Kyselina asparagová v pozici 27 se vyskytuje pouze u UCP a její záměna na asparagin (D27N) vede k částečné inhibici protonového transportu prostřednictvím UCP, ale jejich regulace pomocí purinových nukleotidů není ovlivněna (Klingenberg a Echtay, 2001).

Další zajímavostí je, že v prvním matrixovém segmentu po MACP signatuře následuje aminokyselinový triplet glutamin-n-glutamin striktně konzervativní pro UCP (*n značí libovolnou aminokyselinu*), a poté dvojice glycin-glutamová kyselina, která je také přítomná u všech UCP s výjimkou rostlinných UCP a BMCP1. Glutamovou kyselinou této dvojice (pozice 45) rovněž začíná různě dlouhá nehomologní oblast, na základě které se liší velikost jednotlivých UCP proteinů. Třetí matrixový segment má stejnou velikost u UCP1 až UCP3, UCP4 obsahuje navíc ještě 6 a BMCP1 5 aminokyselin (Ježek a Urbánková, 2000).

Všechny UCP mají každý z transmembránových helixů kódován jedním exonem, UCP1 gen tedy obsahuje 6 exonů. Oproti tomu gen pro UCP2 má 8 exonů a 7 intronů, ale na 5'-koncích byly nalezeny dva exony, které však nejsou translatovány (Ricquier a Bouillaud, 2000 B). Iniciační kodón ATG pro translaci se tedy nachází až na třetím exonu. Exon 8 obsahuje terminační kodón TGA následovaný polyadenylačním místem. Promotorová oblast neobsahuje TATA box nebo CAAT box, ale na rozdíl od UCP1 je bohatá na GC baze (Pecqueur et al., 1999). Zajímavý je však exon 2, který obsahuje 111 bp dlouhý otevřený čtecí rámeček (uORF, z angl. upstream open reading frame) se

třemi ATGs kódující předpokládaný neznámý peptid o 36 aminokyselinách. Sekvence nukleotidů okolo tří ATGs je v poměrně dobré shodě s obvyklými strukturálními požadavky na iniciační místo. Proto existuje možnost, že translace tohoto krátkého peptidu by mohla inhibovat translaci UCP2 proteinu (Pecqueur et al., 1999; Pecqueur et al., 2001). UCP2 gen má u lidí délku 8 kb u lidí a 6,3 kb u myši (Fleury a Sanchis, 1999; Pecqueur et al., 1999). V případě UCP3 genu, který má 7 exonů, se iniciační kodón nachází na druhém exonu (Solanes et al., 1997). Tento gen obsahuje stejně jako UCP1 TATA box (Ricquier a Bouillaud, 2000 B). UCP3 gen vytváří dva mRNA transkripty, UCP3_L a UCP3_S, resp. dlouhé a krátké UCP3 proteiny, které liší pouze přítomností/absencí 37 aminokyselin na C-konci. Tyto aminokyseliny jsou kódovány exonem 7, který však chybí u UCP3_S. Šestý intron UCP3 genu obsahuje štěpný a polyadenylační signál (AATAAA_S), jenž ukončuje transkripční, resp. translační signál, tj. dochází ke vzniku kratšího proteinu UCP3_S (Solanes et al., 1997).



Obr. č. 9: A Srovnání genů uncoupling proteinu 1, 2 a 3 s jednotlivými exony. Iniciační kodón ATG je vyobrazen tučně, vyznačen je i terminační kodón TGA (u lidského UCP3 existují dvě formy proteinů – krátká s TGA_S a dlouhá s TGA_L). Exony, které podléhají translaci jsou označeny růžově. *Převzato z Ricquier a Bouillaud, 2000 B.*

B Ideogram potkaního chromozomu 1. V jednotce q je červeně označeno místo, kde se vyskytují geny pro UCP2 a UCP3. *Převzato z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=10116&chr=1>.*

Gen pro UCP1 se nachází na lidském chromozomu 4 v pozici ~ 157 cM, myším chromozomu 8 a na potkaním chromozomu 19. Gen pro UCP2 je lokalizován na lidském chromozomu 11 v oblasti 11q13 mezi DS11S916 a DS11S911 spojené s inzulin-dependentním diabetem a v blízkosti lokusu (15 cM od 11q21-q22) spojeného s obezitou u Pima indiánů, na myším chromozomu 7 a na potkaním chromozomu 1 v regionu 1q33-q34 spojeném s glukózovou intolerancí a tloušťkou u potkaních modelů diabetu 2. typu (Fleury a Sanchis, 1999; Schrauwen et al., 1999; Borecký et al., 2001; Jia et al., 2009). Gen pro UCP3 je také na lidském chromozomu 11 (11q13) v pozici 81 až 82 cM, na myším chromozomu 7 a na potkaním chromozomu 1. Geny pro UCP2 a UCP3 spolu těsně sousedí, kdy UCP2 gen se nachází o 7 až 8 kb níž od stop kodónu UCP3 genu, což naznačuje genovou duplikaci. Oblast UCP2/UCP3 se podílí na hyperinzulinémií a obezitě (Fleury a Sanchis, 1999; Borecký et al., 2001; Jia et al., 2009). Gen UCP4 je na lidském chromozomu v oblasti 6p11.2-q12, u potkanů na 9. chromozomu. BMCP1 (UCP5) gen byl nalezen na chromozomu X u myši a Xq24 u lidí (Borecký et al., 2001; Bouillaud et al., 2001).

Všechny UCP jsou kódovány jadernou DNA a pravděpodobně využívají TIM a zejména TOM systém k transportu UCP proteinů do mitochondrie, resp. její membrány. Cesta transportu UCP1 pravděpodobně zahrnuje menší komponenty mezimembránového prostoru mitochondrií pro přímé vsunutí proteinu do vnitřní mitochondriální membrány, kde se předpokládá, že dojde k dimerizaci. Ukazuje se, že v transportu proteinu do vnitřní mitochondriální membrány hraje důležitou roli centrální matrixová smyčka a receptorový protein TOM komplexu, tzv. hTom20 (Argyropoulos a Harper, 2002; Ledesma et al., 2002). Velmi málo informací je však známo o transportu ostatních UCP proteinů. Ale je pravděpodobné, že by matrixové smyčky mohly hrát významnou roli v rozpoznání a vsunutí proteinu do vnitřní membrány mitochondrií (Argyropoulos a Harper, 2002).

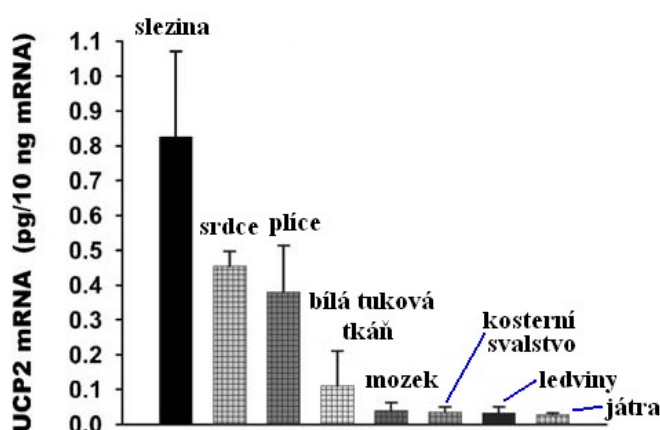
2.2.3. Lokalizace UCP2

Mediátorová RNA UCP2 je rozšířena ve většině orgánů jak u lidí, tak u hlodavců, což může odrážet významné funkce UCP2 v metabolismu (Nedergaard a Cannon, 2003; Pecqueur et al., 2001). V jednotlivých orgánech se však vyskytuje nerovnoměrně, často pouze v určitých typech buněk či buněčných liniích, popřípadě za určitých podmínek.

Určení distribuce v tkáních je založeno zejména na stanovení mRNA UCP2, neboť zjištění lokalizace UCP2 proteinu je velmi problematické vzhledem k nedostatku verifikovaných a dostatečně citlivých protilátek pro detekci proteinu (Pecqueur et al., 2001; Gnanalingham et al., 2006). Vzhledem k tomu, že exprese mRNA UCP2 je vysoká v makrofázích, lymfocytech a Kupfferových buňkách, je tato exprese vysoká i v tkáních bohatých na tyto buňky (slezina, brzlík, kostní dřev) (Larrouy et al., 1997; Négre-Salvayre et al., 1997; Ricquier et al., 1999). Exprese mRNA UCP2 byla zjištěna i v hnědé a bílé tukové tkáni (Matsuda et al., 1997; Carmona et al., 1998). V hnědé tukové tkáni se mRNA UCP2 objevuje ještě před narozením a maxima dosahuje ve 48. hodině života v souladu genezí mitochondrií a reakcí na tepelný stres související s narozením. Následně dochází k poklesu hladiny až na bazální úroveň (Fleury a Sanchis, 1999). RNA UCP2 byla také objevena v srdci a kosterní svalovině, žaludku, střevě, plicích, placentě, slinivce, resp. pankreatických β -buňkách a buňkách imunitního systému (Fleury et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997; Skulachev, 1998; Pecqueur et al., 2001; Nedergaard et al., 2005). V neposlední řadě byla mRNA UCP2 také prokázána v mozku (Richard et al., 1998; Horvath et al., 2003). V mozku je UCP2 exprimován v různé míře, nejvíce však v hypotalamu, resp. v některých jádrech hypotalamu (nucleus supra-chiasmaticus, paraventricularis, dorsomedialis, ventromedialis a arcuatus), v talamu (nucleus submedius), v mozkovém kmeni (dorzální motorické jádro bloudivého nervu) a v limbickém systému (Richard et al., 1998; Richard et al., 2001; Horvath et al., 2003). Exprese UCP2 byla také zjištěna v mikroglíích, tedy makrofágům podobných buňkách přítomných v centrálním nervovém systému (Nedergaard a Cannon, 2003). Přítomnost mRNA UCP2 v neuronech exprimujících kortikotropin-uvolňující faktor a arginin-vasopresin poukazuje na roli UCP2 v řízení neuroendokrinních funkcí a chování (Richard et al., 2001; Horvath et al., 2003).

Alán a spol. se ve své práci pokusili zjistit absolutní hladiny mRNA uncoupling proteinů u potkanů a myší. Obsah mRNA UCP2 byl relativně vysoký od 0,4 do 0,8 pg/10 ng celkové mRNA ve slezině, srdci potkanů a plicích potkanů a myší. Zjistili také, že absolutní množství UCP2 transkriptů se snižuje v tomto pořadí: slezina > srdce > plíce > bílá tuková tkáň > mozek > kosterní svalstvo > ledviny > játra, v rozsahu 30-násobných rozdílů (obr. č. 10). Mediátorová RNA UCP2 je v srdci a plicích potkanů v ekvivalentních hladinách, ale u myší jsou v srdci transkripty až 40× nižší než v plicích. Vysoký výskyt ve slezině a plicích může odrážet převládající expresi v přítomných makrofázích (Alán et al., 2009). Vysoká exprese UCP2 v plicích může

mít podíl na rozvoji plicních nemocí, nicméně přesná role zůstává dosud neobjasněna (Mattiasson a Sullivan, 2006). Vysoká exprese UCP2 v makrofázích ztěžuje přesné určení přítomnosti mRNA či proteinu v různých orgánech. Navíc přirozenou povahou makrofágů je jejich hromadění v různých oblastech orgánů za určitých podmínek. To znamená, že invaze makrofágů může mít výrazný vliv na hladiny mRNA UCP2 a UCP2 proteinů, aniž by odrážela expresi buněk jednotlivých orgánů. Například v plicích se makrofágy hromadí během horečky, v mozku během horečky, ale i při ischemickém poškození. Také stres, kterým je nepochybně např. hladovění, způsobuje akumulaci makrofágů v gastrointestinálním traktu (Nedergaard a Cannon, 2003).



Obr. č. 10: Absolutní množství mRNA UCP2 ve vybraných tkáních potkanů. *Převzato z Alán et al., 2009.*

Přestože v některých tkáních (např. v srdeční tkáni, kosterním svalstvu apod.) je mRNA UCP2 dobře exprimována a snadno zjištělná, UCP2 protein není patrně detekovatelný. To znamená, že exprese mRNA UCP2 nemusí vést k proporcionálnímu vzniku UCP2 proteinu (Cannon et al., 2006; Echtaý, 2007). Výrazné diskrepance mezi mRNA UCP2 a UCP2 proteinem pravděpodobně odráží translační regulaci mRNA UCP2 pomocí předního otevřeného čtecího rámce (uORF, z angl. upstream open reading frame) lokalizovaného na 2. exonu UCP2 genu, který silně inhibuje expresi proteinu (Gnanalingham et al., 2006; Hurtaud et al., 2006). Tento uORF v 5'netranslatované oblasti teoreticky koresponduje s 36 aminokyselinovým peptidem, u něhož nebylo doposud popsáno, zda se vytváří za všech okolností. Delece v uORF ($\Delta 21-36$) ale vždy vede ke zvýšení translace proteinu (Cannon et al., 2006; Hurtaud et al., 2006). Také některé mutace (ATG3/stop, ATG1-2) v uORF vedou ke zvýšení translace proteinu (Hurtaud et al., 2006). UCP2 protein se hlavně vyskytuje ve slezině,

žaludku, plicích, střevech a bílé tukové tkáni (Nedergaard a Cannon, 2003; Gnanalingham et al., 2006). Protein byl také objeven v mitochondriích izolovaných z tymocytů (Krauss et al., 2002) a v pankreatických ostrůvcích (Zhang et al., 2001).

Rousset a spol. ve své práci popisují, že poločas rozpadu UCP2 proteinu je okolo 30 minut. Ve srovnání s poločasem pro UCP1 (okolo 30 hodin) lze tedy říci, že UCP2 je velmi nestabilním proteinem a pravděpodobně souvisí s rozdílnými fyziologickými funkcemi. V případě mutace D212N byla zjištěna 60% redukce poločasu rozpadu, která se vysvětluje vyšší nestabilitou mutovaného UCP2 proteinu. Degradace proteinů ve vnitřní mitochondriální membráně je zajišťována AAA proteázami (z angl. ATPase Associated with a variety of cellular Activities), ale to neplatí pro UCP proteiny. Na jejich proteolýze se pravděpodobně podílí Oma1, Mop112 nebo jiné doposud neznámé proteázy (Rousset et al., 2007).

2.2.4. UCP2 a játra

RNA UCP2 v játrech byla poprvé popsána Fleuryem a spol. (Fleury et al., 1997). Vysoké hladiny mRNA jsou exprimovány u fetálních jater hlodavců výhradně v monocytech a makrofázích. Za normálních podmínek je přítomnost ve zralých játrech způsobená hlavně expresí v Kupfferových buňkách (Fleury a Sanchis, 1999). Exprese v hepatocytech je nízká (Mattiasson a Sullivan, 2006), ale může být zvýšena vlivem oxidačního stresu, steatózy (Cortez-Pinto et al., 1999) nebo systematické reakce na bakteriální infekci (Cortez-Pinto et al., 1998).

Množství UCP2 transkriptů ve fetálních játrech potkanů je významně vyšší než u dospělých a navíc tato hladina je srovnatelná s hladinou transkriptů ve slezině, která vykazuje nejvyšší expresi u dospělých lidí a hlodavců, ale i plodů. Tyto poznatky naznačují, že existuje specifický vývojový způsob exprese UCP2 v játrech. UCP2 je u plodu exprimována v řadě tkání daleko dříve než UCP1 v hnědé tukové tkáni. To znamená, že hlavní role UCP2 během intrauterinního vývoje nemá vztah k termogenezi. Během perinatálního období byla pozorována v tkáních s vysokým obsahem makrofágů rozdílná exprese – v játrech se vyskytovala vysoká exprese UCP2, která po narození klesala, zatímco ve slezině a plicích nebyly zjištěny žádné změny. Tento rozdíl je vysvětlován pravděpodobným vztahem fetálních jater k hematopoéze a přesunu této aktivity před narozením do kostní dřeně. Vývoj monocytů/makrofágů ve fetálních

játrech představuje hlavní místo exprese UCP2. To naznačuje, že hlavní role UCP2 je v diferenciaci a/nebo funkci leukocytů myelopoetické řady, a tak ve vývoji imunitního systému, nikoliv v řízení mitochondriální energetiky v játrech během perinatálního období (Hodný et al., 1998).

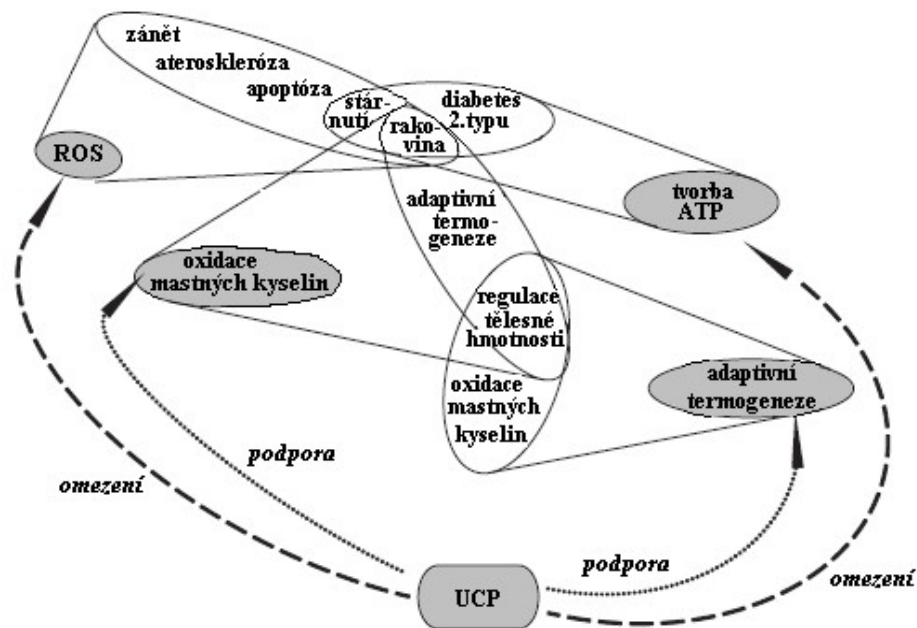
UCP2 není za normálních podmínek významně exprimován v hepatocytech. Za určitých okolností (cirhóza, endotoxinem zprostředkované poškození jater) se však zvyšuje jaterní exprese UCP2 primárně v samotných hepatocytech. Obdobná situace nastává také v případě parciální hepatektomie. Horimoto a spol. také detekovali signifikantní počet UCP2 pozitivních hepatocytů v játrech myši před parciální hepatektomií, což ukazuje, že Kupfferovy buňky nejsou exkluzivním místem exprese UCP2 v játrech. Tato detekce byla rovněž podložena nálezem UCP2 proteinu v hepatocytech a žlučových epiteliálních buňkách. Absence nebo nedostatečná funkce UCP2 v regenerujících se játrech má za následek zvýšení produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a negativně moduluje kontrolu buněčného cyklu. V procesu regenerace se tedy funkce UCP2 jeví jako klíčová (Horimoto et al., 2004). Na rozdíl od Horimota a spol., který stanovoval expresi UCP2 proteinu pomocí imunoblotu u myši nejdříve 8 hodin po parciální hepatektomii, jsme se rozhodli zjistit, jaká je exprese mRNA UCP2 u potkanů v prvních 24 hodinách, tj. již v 1., 3. a 6. hodině, ale i ve 12. a 24. hodině po parciální hepatektomii.

Výskyt byl potvrzen rovněž u transformovaných hepatocytů, např. některé lidské linie hepatokarcinomu (H4IIE) exprimují UCP2 mechanismem hypometylace DNA. Tyto buňky představují typické embryonální a fetální stádium vývoje a exprese UCP2 by mohla být považována za důkaz návratu k fetálnímu fenotypu (Carretero et al., 1998; Fleury a Sanchis, 1999; Kimura et al., 1999).

2.2.5. Možně funkce UCP2

Uncoupling protein 2 je zapojen do mnoha fyziologických a patologických procesů (obr. č. 11) jako například adaptivní termogeneze, regulace oxidace mastných kyselin, podíl na zánětu, prevence tvorby reaktivních kyslíkových radikálů, regulační funkce u diabetu 2. typu, regulace tělesné hmotnosti, prevence aterosklerózy a stárnutí, neuroprotektivní efekt, navíc je diskutována potenciálně ochranná role UCP2 v rozvoji

rakoviny (Mattiasson a Sullivan, 2006; Nübel a Ricquier, 2006). Všechny možné fyziologické funkce uncoupling proteinu 2 jsou ale stále předmětem debat.



Obr. č. 11: Možné fyziologické a patologické funkce uncoupling proteinu. *Převzato z Nübel a Ricquier, 2006.*

2.2.5.1. *Adaptivní netřesová termogeneze*

Po objevení UCP2 se předpokládalo, že jeho funkce bude velmi podobná UCP1, tj. regulace tvorby tepla. V průběhu let se ale většina autorů přiklání k názoru, že UCP2 má na regulaci tělesné teploty malý nebo dokonce žádný podíl. Jedním z důkazů je skutečnost, že UCP2 byl detekován v tkáních ryb a rostlin, u kterých se adaptivní termogeneze nevyskytuje (Brand a Esteves, 2005). Navíc myši s knock-outem UCP1 genu (UCP1 $-/-$) jsou velmi citlivé na chlad, přestože je u nich zvýšená exprese UCP2. Oproti tomu UCP2 $-/-$ myši nejsou citlivé na chlad (Saleh et al., 2002). Vysvětlením, proč se UCP2 nepodílí na netřesové termogenezi, může být skutečnost, že i přes zvýšenou expresi je koncentrace UCP2 proteinu nízká (1000krát menší než UCP1 proteinu) (Echtay, 2007).

Nicméně existuje možnost, že se podílejí na tvorbě bazálního tepla. Genetické studie u lidí ukazují, že mikrosatelitní markery (zejména D11S916) vytvářející 5 cM region v sousedství 11q13, tj. v oblasti obklopující UCP2 gen, jsou geneticky silně spojeny s úrovní klidového metabolismu (Bouchard et al., 1997). Také polymorfizmy v kódující

oblasti UCP2 genu (substituce Ala55Val na 4. exonu a 45 bp velká inserce/delece na exonu 8 UCP2 genu) jsou spojeny s úrovní energetického výdeje během spánku (Walder et al., 1998). Tyto údaje mohou souviset s faktem, že bazální protonový únik přes vnitřní mitochondriální membránu je ve většině tkání asociován s klidovou metabolickou úrovní (Rousset et al., 2004).

UCP2 se tedy významně nepodílí na vytváření celkové tělesné teploty, ale uplatňuje se při termogenní funkci v mozku, kde má vztah k udržení teplotní stálosti mikroprostředí synapsí. UCP2 je exprimován v mitochondriích neuronů, často v těsné blízkosti synaptických váčků a synaptických membrán axonů, kde jeho aktivace vede k tvorbě tepla. Tato mírná změna presynaptické teploty může být prospěšná pro plasticitu synapse a funkčnost synaptického přenosu (Horvath et al., 2003), zvýšená exprese UCP2 byla také zjištěna v míše po chladové expozici. Významný vliv teploty je také při rozvoji poškození mozku, kdy při hypotermii dochází k jeho zpomalení a při hypertermii k jeho zrychlení. To naznačuje, že výrazné zvýšení teploty v neuronech spolu s vysokou expresí UCP2 může způsobovat jejich vyšší náchylnost k rozvoji akutního poškození mozku (Mattiasson a Sullivan, 2006).

2.2.5.2. Regulace oxidace mastných kyselin

UCP2 a UCP3 jsou exprimovány v několika typech buněk (adipocytech, kosterním svalstvu a makrofázích), které se především podílejí na metabolismu mastných kyselin. Řada publikací popisuje signifikantní změny exprese UCP2 a UCP3 v situacích jako například hladovění, vysokotuková dieta, krátko- nebo dlouhodobé cvičení, kdy dochází ke zvýšení hladiny volných mastných kyselin v krvi nebo intenzity oxidace mastných kyselin (Brand a Esteves, 2005; Echtay, 2007).

Vztah mezi mastnými kyselinami a UCP2 expresí byl prvně zjištěn při pokusech, kdy se hlodavcům podávala vysokotuková dieta. Bylo zjištěno, že v tukové tkáni potkanů a kmenů inbredních myší A/J a C57BL/KsJ (KsJ) rezistentních k obezitě byla pozorována zvýšená exprese mRNA UCP2, zatímco u kmenů inbredních myší C57BL/6J (B6) náchylných k obezitě nikoliv (Fleury a Sanchis, 1999; Schrauwen a Hesselink, 2002). Vyšší přítomnost mastných kyselin v dietě zvyšovala mRNA UCP2 pouze v bílé tukové tkáni, ale ve svalech a hnědé tukové tkáni nebyla exprese ovlivněna. Při hladovění vyšší sérové hladiny volných mastných kyselin a ketonů způsobují vzrůst mRNA UCP2 v kosterním svalstvu hlodavců (Fleury a Sanchis, 1999).

Zvýšená exprese UCP2 byla také zjištěna v hepatocytech ob/ob myší, u kterých se rozvíjela jaterní steatóza (Boss et al., 2000).

Zvýšené množství tuku může indukovat expresi UCP2 a UCP3, a proto se předpokládá, že funkcí těchto proteinů je export aniontů mastných kyselin z mitochondriální matrix do cytosolu v případě velkého nadbytku mastných kyselin uvnitř mitochondrií. Důvodem je, že zvýšená koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin může v mitochondriích působit toxicky (Rousset et al., 2004; Echtay, 2007), neboť oxidace mastných kyselin vede k vyššímu přísunu elektronů do dýchacího řetězce, a tím i k nadprodukci ROS. Indukce exprese UCP2, zprostředkovaná vysokým množstvím mastných kyselin, limituje toxicitu ROS redukcí elektrochemického gradientu dýchacího řetězce a snížením zpětného toku protonů. Po oxidaci nadbytečných mastných kyselin se množství UCP2 poté vrací zpět k normálním hladinám. V pankreatických β -buňkách akumulace lipidů vytváří tzv. lipotoxicitu, která tak vysvětluje poškození funkce β -buněk při obezitě (Wang et al., 1999; Boss et al., 2000). Bylo také prokázáno, že adenovirově zprostředkovaná exprese UCP2 zlepšuje glukózou indukovanou sekreci inzulínu pankreatickými ostrůvky s vysokým obsahem lipidů u diabetických (fa/fa) ZDF potkanů (z angl. Zucker diabetic fatty), kteří tuto funkci mají potlačenou (Wang et al., 1999).

Řetězce polynenasycených mastných kyselin membránových fosfolipidů jsou velmi senzitivní k oxidaci, kdy mohou vytvářet agresivní oxidanty jako 4-hydroxynonenal. UCP2 a UCP3 proteiny mohou transportovat anionty peroxidů mastných kyselin ven z mitochondriální matrix následně po jejich uvolnění z fosfolipidů pomocí fosfolipáz jako ochranný mechanismus proti poškození mitochondriálních proteinů a DNA (Brand a Esteves, 2005; Echtay, 2007).

Mastné kyseliny a UCP2 hrají důležitou roli i po narození, kdy dochází díky příjmu mateřského mléka s vysokým obsahem tuků ke zvýšení hladiny volných mastných kyselin. Ty následně indukují expresi UCP2 v plicích a mozku. V mozku poté UCP2 pravděpodobně participuje na antioxidační ochraně a může mít neuroprotektivní funkci v případě poškození mozku. Epidemiologické studie také ukázaly, že kojenci s nízkou porodní hmotností vykazují nedostatečný růst a navíc se u nich zvyšuje vnímavost k diabetu a plicním onemocněním, v jejichž rozvoji hrají roli UCP2 a UCP3 (Mattiasson a Sullivan, 2006). Mostyn a spol. zjistili, že nízká porodní váha je asociována s tkáňově-specifickou expresí UCP, neboť exprese UCP2 a UCP3 v tukové tkáni byla u prasat

s nižší porodní hmotností menší, ale exprese UCP2 v plicích a UCP3 v kosterním svalstvu nebyla ovlivněna (Mostyn et al., 2005).

2.2.5.3. Regulace produkce reaktivních kyslíkových radikálů

Nadprodukce ROS v mitochondriích často vede k peroxidaci membránových fosfolipidů a produkci reaktivních aldehydů. Celý tento proces vede k oxidačnímu stresu a mitochondriální dysfunkci, a tak se podílí na patogenezi řady onemocnění, buněčném stárnutí a apoptóze (Nübel a Ricquier, 2006). V mitochondriích je asi 1 až 2 % kyslíku konvertováno prostřednictvím komplexu I a III na superoxidový anion, který následně umožní vznik dalších ROS (Ježek et al., 2004). Již nepatrně zvýšená permeabilita pro protony (snížení protonového elektrochemického gradientu) přes vnitřní mitochondriální membránu stimuluje respiraci, tj. zvyšuje transportní rychlost elektronů, a vede ke snížení tvorby ROS. UCP2 je proto v literatuře popisován jako účinný modulátor mitochondriální tvorby ROS, neboť stimuluje spotřebu kyslíku a zkracuje dobu života ubisemichinonového radikálu, který je iniciačním činidlem pro tvorbu ROS (Ježek et al., 2004; Rousset et al., 2004; Nübel a Ricquier, 2006). Důkazem o této funkci UCP2 je jeho inhibice pomocí purinového nukleotidu GDP, která zvyšuje membránový potenciál a produkci ROS v mitochondriích (Echtay et al., 2002; Echtay, 2007).

Další možnou funkcí je zapojení uncoupling proteinů v procesu apoptózy a stárnutí, avšak UCPs nemohou samostatně vyvolat apoptózu. Panuje také shoda, že existují UCP-typově specifické rozdíly v působení UCP vedoucí buď k ochranným efektům, nebo naopak ke smrti. Například neurony a jejich synaptické konce jsou chráněny proti dysfunkci a apoptické smrti pomocí neuron-specifického UCP4, stejně jako pomocí UCP2 exprimovaného v neuronech pomocí mechanismů vedoucích k potlačení produkce ROS a ke stabilizaci homeostázy intracelulárního vápníku. Oproti tomu jiné publikace popisují UCP3 jako komponentu zvyšující citlivost buněk na stimuly apoptózy (např. TNF α , volné radikály, virové a bakteriální infekce, toxiny, chemoterapeutika apod.) (Nübel a Ricquier, 2006). Navíc buňky se zvýšenou expresí UCP3 mají vyšší mitochondriální poměr významného apoptického markeru Bax/Bcl-2 díky zvýšené translokaci Bax z cytosolu do mitochondrií.

Byly také popsány tkáňově specifické změny v expresi UCP2 způsobené věkem. Pozorované zvýšení UCP2 exprese v játrech během stárnutí vede k omezení produkce

ATP a navíc souvisí se změnami v expresi mitochondriálních genů u starších zvířat (Nübel a Ricquier, 2006).

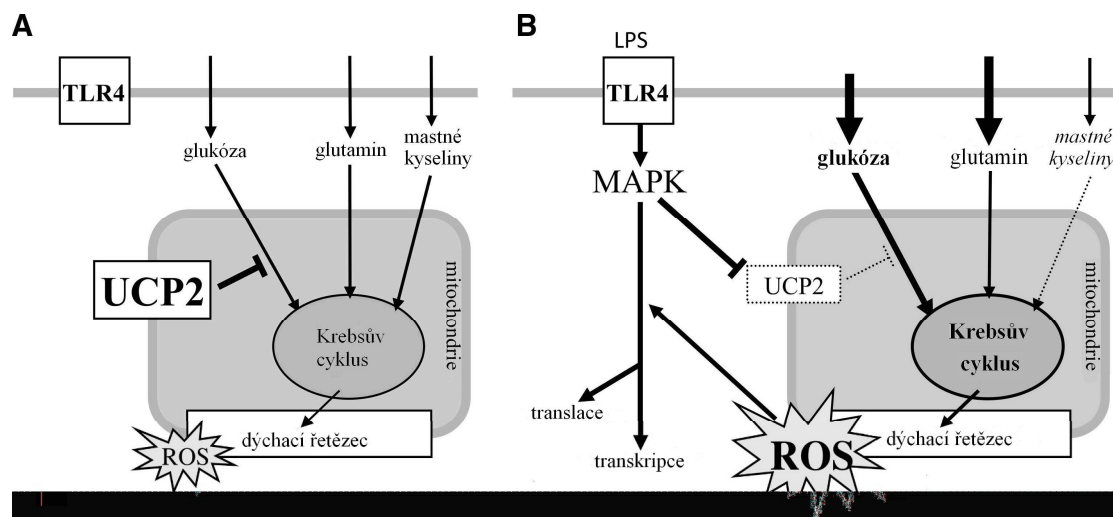
Závěrem lze říci, že UCP proteiny hrají potenciální roli jako tkáňově specifické modulátory produkce ROS, ATP produkce během apoptózy a buněčného stárnutí.

2.2.5.4. Zapojení UCP2 do imunitní odpovědi – zánětu

Zánět je jedním z nejdůležitějších patofyziologických procesů buňky, během kterého mitochondrie vytvářejí volné kyslíkové radikály jako superoxidový anion, který je konvertován na peroxid vodíku nebo hydroxylové radikály. Mitochondriální tvorbu ROS je schopen modulovat UCP2 protein (Négre-Salvayre et al., 1997), který se hojně vyskytuje ve slezině, plicích a izolovaných makrofázích, což nasvědčuje jeho roli v imunitní nebo zánětlivé odpovědi. Výzkum imunitní odpovědi na infekci *Toxoplasma gondii* u myši s knock-outem UCP2 genu (UCP2 $-/-$) ukázal úplnou rezistenci vůči patogenu na rozdíl od letality u „wild-type“ myši. Důvodem bylo, že makrofágy UCP2 $-/-$ myši vytvářely více ROS, čímž docházelo k lepší odpovědi imunitního systému na infekci. Molekulární mechanismus této zvýšené imunitní odpovědi UCP2 $-/-$ myši je založen na pozoruhodném zvýšení klíčových kroků v aktivaci kaskády jaderného faktoru κ B (NF κ B) včetně nárůstu kinázové aktivity I κ B a jaderné translokace podjednotky NF κ B. To poté vede k vyšší expresi indukovatelné NO-syntázy a zánětlivých cytokinů (Nübel a Ricquier, 2006). UCP2 deficientní makrofágy také lépe eliminovaly bakterii *Salmonella typhimurium in vitro* oproti normálním makrofágům. V případě bakterie *Listeria monocytogenes* však byla eliminace mezi těmito oběma typy makrofágů podobná (Emre a Nübel, 2010).

UCP2 se podílí na imunitní odpovědi pomocí regulace produkce ROS. V časných stádiích odpovědi na bakteriální lipopolysacharidy byla popsána down-regulace UCP2 v imunitních buňkách během jejich aktivace. Snížení UCP2 proteinu umožní vznik potřebných ROS, které aktivují makrofágy (obr. č. 12) a další imunitní buňky, které eliminují patogen. Produkce ROS ale musí být nakonec zregulována, aby nedošlo k poškození infikované tkáně. Proto v pozdních stádiích dochází k up-regulaci UCP2 exprese, která potlačí tvorbu ROS, což umožní ochranu všech buněk proti oxidačnímu stresu. Regulace hladiny ROS však musí být jemná, a proto UCP2 proteiny rychle vznikají, ale jsou i velmi rychle degradovány (poločas rozpadu UCP2 proteinu je okolo 30 minut) (Nübel a Ricquier, 2006; Rousset et al., 2007). Lipopolysacharidy však

signifikantně zvyšují mRNA UCP2 v játrech, svalech a tukové tkáni, což naznačuje jeho roli v produkci tepla a zvýšeného energetického výdeje během infekce (Faggioni et al., 1998).



Obr. č. 12: UCP2 během aktivace makrofágů. A – V klidových makrofázích je UCP2 silně exprimován. Mitochondrie oxiduje glukózu, glutamin a mastné kyseliny stejnou měrou. B – Po stimulaci lipopolysacharidy (LPS) je exprese UCP2 inhibována pomocí p38 a c-Jun NH2-terminálních kináz (JNK), čímž výrazně stoupá oxidace glukózy oproti oxidaci glutaminu a mastných kyselin. Následkem toho dochází k ovlivnění toku elektronů dýchacím řetězcem, což vede k vyšší produkci mitochondriálních ROS a aktivaci mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK). *Převzato z Emre a Nübel, 2010.*

Snížení UCP2 bylo pozorováno rovněž u ovariální buněk během folikulárního růstu, ale naopak během preovulačního období dochází ke zvýšené expresi (Nübel a Ricquier, 2006). Během orgazmu u žen dochází k rychlému snížení UCP2 a tedy produkci ROS, která je potřebná pro uvolnění oocyty. Tento stav však musí být velmi účinně regulován prostřednictvím UCP2, aby nedošlo k destrukci oocytů (Rousset et al., 2007). Zánětlivé procesy hrají důležitou roli i při rozvoji kardiovaskulárních nemocí a poškození mozku, u kterých mají protizánětlivé vlastnosti UCP2 prospěšný efekt na progresi onemocnění (Mattiasson a Sullivan, 2006). U autoimunitního diabetu u UCP2 *-/-* myši dochází k významnější akumulaci makrofágů v pankreatických ostrůvcích, což ukazuje na roli UCP2 v adaptivní imunitní odpovědi. Masivní přírůstek vysoce zánětlivých makrofágů v ostrůvcích UCP2 *-/-* diabetických myši vede k akutnímu zánětu, který je zodpovědný za destrukci β - buněk (Emre a Nübel, 2010).

Při studiích $-866G/A$ polymorfizmu v promotorové oblasti UCP2 u lidí bylo zjištěno, že G alela je asociována s nižší expresí UCP2 v lymfocytech a makrofázích oproti A alele. Tento polymorfismus moduluje rozvoj diabetické neuropatie u pacientů s diabetem 1. typu. G alela je také spojena s náchylností ke sclerosis multiplex, asymptomatické ateroskleróze krkavice, ale také k několika zánětlivým onemocněním jako revmatická artritida, systémový lupus erythematosus, Wegenerova granulomatóza, Churg-Strauss syndrom, Crohnova choroba a ulcerativní kolitida (Emre a Nübel, 2010).

Studie tedy ukazují, že UCP2 řídí produkci mitochondriálních ROS a aktivaci imunitních buněk modulací MAP kináz. Regulační schopnost UCP2 pomocí přímého zapojení do produkce cytokinů a oxidu dusnatého, ale také do buněčné migrace, byla ověřena na mnoha modelech infekce, zánětu a autoimunity (Emre a Nübel, 2010).

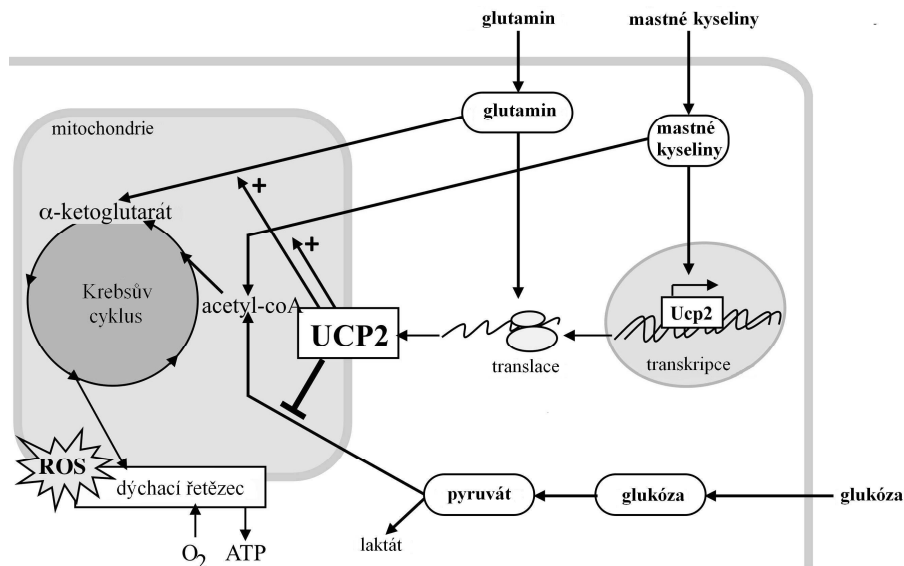
2.2.5.5. UCP2 a diabetes mellitus typ 2

Mediátorová RNA UCP2 je exprimována v Langerhansových ostrůvcích pankreatu a v mitochondriích β -buněk bylo prokázáno detekovatelné množství UCP2 proteinu, který hraje roli v regulaci sekrece inzulínu (Chan et al., 2001; Chan et al., 2004). Navíc lokalizace UCP2 genu na 11. chromozomu v oblasti 11q13 u lidí je spojena s hyperinzulinémií a obezitou (Fleury et al., 1997).

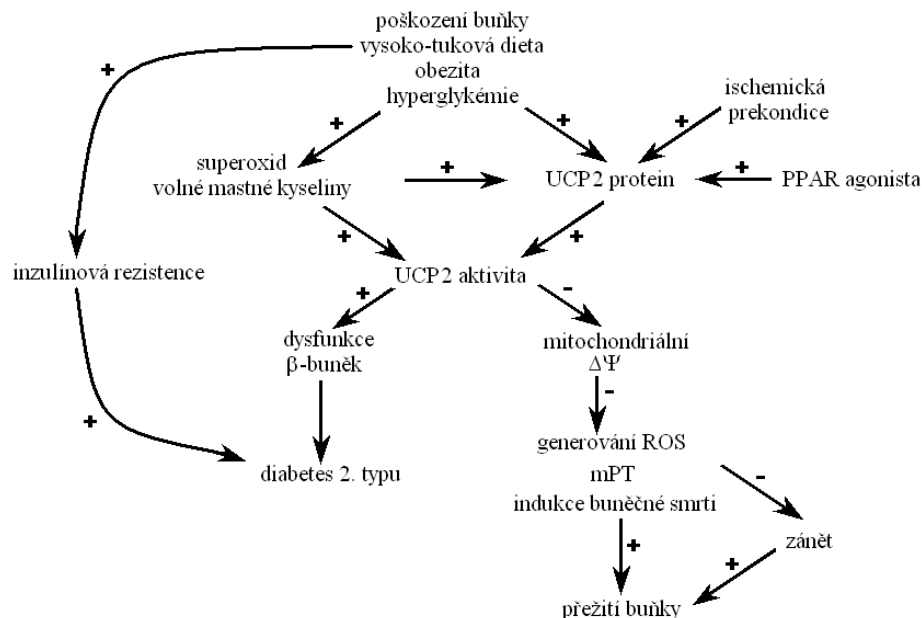
Sekrece inzulínu je řízena množstvím glukózy vstupující do β -buněk usnadněnou difúzí prostřednictvím GLUT-2 přenašeče, jehož aktivace nezávisí na inzulínu. Glukóza se poté metabolizuje za vzniku ATP a zvyšuje se tak poměr ATP/ADP, čímž se uzavírají ATP-senzitivní draslíkové kanály. To má za následek omezené vytékání K^+ a depolarizaci buněčné membrány, což vede k otevření napěťově řízených vápníkových kanálů, kdy extracelulární Ca^{2+} vstupuje do buněk a aktivuje Ca^{2+} dependentní proteinkinázy. Ty pak spouštějí sekreci inzulínu exocytózou (Zhang et al., 2001; Echtay, 2007).

Vzhledem k tomu, že UCP2 zvyšují permeabilitu vnitřní mitochondriální membrány pro protony a snižují tak syntézu ATP, snižují také tvorbu ATP v rámci glukózového metabolismu v buňkách pankreatu. Následkem toho dochází k zhoršení glukózou stimulované sekrece inzulínu, tzn. UCP2 je tedy jejím negativním regulátorem (Brand a Esteves, 2005; Echtay, 2007). Zvýšení UCP2 exprese proto vede k potlačení glukózou-stimulované sekrece inzulínu a může se tak podílet na nedostatku inzulínu u diabetu

typu 2, zatímco absence UCP2 sekreci inzulínu zvyšuje (Chan et al., 2004; Affourtit a Brand, 2008).



Obr. č. 13: Vliv UCP2 na glukózový metabolismus. UCP2 inhibuje glukózovou oxidaci, naopak glutamin a mastné kyseliny indukují expresi UCP2. Tento protein je nezbytný pro oxidaci glutaminu a mastných kyselin při snížené oxidaci glukózy, což naznačuje, že se UCP2 podílí na výběru substrátů, které jsou v mitochondriích využívány. *Převzato z Emre a Nübel, 2010.*



Obr. č. 14: Schéma role UCP2 v protekci buněk a rozvoji diabetu. Poškození buňky, vysoko-tuková dieta, obezita a hyperglykémie vedou ke zvýšení hladin superoxidů a volných mastných kyselin (FFA), které stimuluji expresi a aktivitu UCP2. Vysoké hladiny FFA také vedou k akumulaci tuku v játrech a svalech, která podporuje

inzulínovou rezistenci a rozvoj diabetu 2. typu. Množství UCP2 proteinu může být také zvýšeno subletálním stresem (ischemická prekondice) a PPAR agonisty. Vyšší UCP2 aktivita způsobuje mírnou mitochondriální depolarizaci, která snižuje tvorbu ATP a kyslíkových radikálů, ale také indukuje mitochondriální permeability (mPT) a aktivaci mitochondriemi zprostředkované buněčné smrti. V pankreatických β -buňkách vede redukce ATP hladiny ke snížení inzulínové sekrece, která tak podporuje rozvoj diabetu 2. typu. V buňkách vystavených stresu se zdá, že redukce tvorby ROS a buněčné smrti umožňuje přežití a snížení zánětlivé odpovědi. *Převzato z Mattiasson a Sullivan, 2006.*

Zhang a spol. zjistili, že myši s knock-outem UCP2 měly vysoké hladiny ATP a zvýšenou glukózou stimulovanou sekreci inzulínu, což ukazuje na nepřítomnost odpřažení respirace (Zhang et al., 2001; Rousset et al., 2004). Transkripce UCP2 v β -buňkách se zvyšuje také působením mastných kyselin. Byla proto vyslovena hypotéza, že obezita, jež je považována za hlavní rizikový faktor v patogenezi diabetu 2. typu, navozuje diabetes nadměrnou aktivací UCP2. Tato hypotéza je též silně podpořena poznatkem, že vystavení buněk ostrůvků oleátu vede nejen k nárůstu množství mRNA UCP2 a snížené sekreci inzulínu po glukózových podnětech, ale také k odpřažení s následným snížením mitochondriálního membránového potenciálu (Lameloise et al., 2001).

Polymorfismus $-866G/A$ v promotorové oblasti UCP2 genu zvyšuje jeho transkripční aktivitu a je asociován se zvýšeným rizikem diabetes mellitus 2. typu u obézních lidí. Navíc UCP2 exprese signifikantně koreluje s inzulínovou rezistencí (Ježek, 2002; Nübel a Ricquier, 2006). Nediabetici s $-866A$ alelou měli sníženou inzulínovou odpověď na intravenózní a perorální aplikaci glukózy, to znamená, že mají vyšší riziko vzniku diabetu. Podobně měli také diabetici 2. typu s touto alelou nižší sekreci inzulínu během glukózového tolerančního testu, a proto je u nich žádoucí častější aplikace inzulínu v rámci terapie. Navíc bylo zjištěno, že si tito nositelé musí dříve od diagnostiky onemocnění aplikovat inzulín. $-866A$ alela se však zdá, že snižuje riziko vzniku diabetické neuropatie, onemocnění věnčitých tepen a může přispívat k biologické variabilitě inzulínové sekrece a citlivosti. Naopak ale zvyšuje riziko metabolického syndromu a vyšších plazmatických markerů oxidačního stresu. G alela je poté asociována s redukovanou expresí mRNA v tukové tkáni a transkripční aktivitou, vysokým BMI, zvýšeným rizikem obezity, inzulínové odpovědi na glukózu a sníženým rizikem diabetu 2. typu. Pacienti s $-866G$ alelou mají nižší hladiny krevních

triacylglycerolů, ale vyšší množství LDL cholesterolu a vyšší inzulínovou citlivost. Snížené riziko vzniku diabetu 2. typu mají tedy nositelé -866G/A a -866A alel oproti osobám s G alelami, kteří mají zvýšené riziko vzniku diabetu a obezity (Chan a Kashemsant, 2006; Jia et al., 2009).

Lze tedy říci, že snížení exprese UCP2 by bylo při léčbě diabetu velmi prospěšné. Na druhou stranu UCP2 reguluje tvorbu ROS, a tak by mohla nízká úroveň exprese UCP2 v β -buňkách vést ke zvýšení tvorby ROS.

2.2.5.6. Regulace tělesné hmotnosti

Energetická balance u zvířat je metabolický stav, který existuje, když celkový energetický výdaj je v rovnováze s příjmem. Precizní regulace energetické homeostázy je velmi komplexní a zahrnuje řadu systémů. Jestliže energetický příjem převyšuje výdej, poté se přebytek ukládá ve formě tuku v adipocytech. Výsledkem je zvýšení tělesné hmotnosti až obezita (BMI vyšší než 30). Adipocyty jsou schopny pojmout pouze určité množství tuku a při překročení následně tuk zaplavuje ostatní tkáň, což vede k ektopické akumulaci triacylglycerolů ve svalech a játrech a rovněž ke zvýšení hladiny volných mastných kyselin v plazmě. Akumulace tuku tak přispívá k rozvoji jaterní a svalové inzulínové rezistenci, glukózové intoleranci a diabetu a volné mastné kyseliny v plazmě k rozvoji kardiovaskulárních chorob. Aktivace fyziologického mechanismu odpřažení, například účinkem uncoupling proteinů, upoutala nedávno značný zájem jako terapeutický prostředek pro léčbu obezity (Mattiasson a Sullivan, 2006).

Expese mRNA UCP2 v bílé tukové tkáni myši rezistentních k obezitě (A/J) je vyšší než u myši náchylných k obezitě (B6). Kromě toho, při vysokém podílu tuku v potravě došlo u druhu A/J ke zvýšení exprese mRNA UCP2, zatímco u druhu B6 ne. Chybějící zvýšení UCP2 u druhu B6 svědčí o přispívání UCP2 v jejich vnímavosti k obezitě (Fleury et al., 1997; Schrauwen et al., 1999). Schopnost některých jedinců odolávat přírůstku hmotnosti tedy souvisí s možností zvýšené regulace UCP2 (Saleh et al., 2002). U myši krmených rybím olejem na rozdíl od myši krmených převážně sacharidy došlo ke zvýšení mRNA UCP2 v játrech a mRNA UCP3 v kosterní svalovině (Tsuboyama-Kasaoka et al., 1999). Zdá se, že u lidí je -866G/A polymorfismus v UCP2 promotorové oblasti (minoritní A-alela) signifikantně asociován se zvýšenou expresí mRNA v tukové tkáni a tím se sníženým rizikem obezity u lidí středního věku (Esterbauer et al., 2001;

Nübel a Ricquier, 2006; Jia et al., 2009). UCP2 se tedy může podílet na regulaci rozvoje obezity.

Byl objeven také polymorfismus ve 4. exonu UCP2 genu, kde může dojít k záměně alaninu za valin v pozici 55 (Ala55Val). Lidé s VV genotypem, v porovnání s A/V a A/A genotypem, mají nižší stupeň odpřažení oxidační fosforylace a energetického výdeje, vyšší metabolický poměr a riziko obezity stejně jako vyšší incidenci diabetu (Chan a Kashemsant, 2006; Jia et al., 2009). Jiné studie však ukazují, že tento polymorfismus není asociován s metabolickým syndromem, BMI, obezitou, inzulínovou sekrecí a diabetem. V UCP2 genu byla také nalezena 45 bp inzerce v 8. exonu (inzerce/delece, tzv. I/D polymorfismus). Doposud však byly publikovány rozporuplné studie. V některých studiích není pozorována asociace s obezitou, BMI, inzulínovou sekrecí apod., v jiných je popisováno, že osoby s I-alelou mají signifikantně vyšší BMI a riziko vzniku obezity (Jia et al., 2009).

UCP2 se tedy podílí na energetickém metabolismu a rozvoji obezity u hlodavců a lidí, přesto potenciální role tohoto proteinu jako farmakologického cíle pro léčbu obezity je stále nejasná (Mattiasson a Sullivan, 2006).

2.2.5.7. UCP2 a prevence aterosklerózy, stárnutí

UCP2 je také přítomný v makrofázích, které se významně podílejí na rozvoji aterosklerózy, a navíc je významným regulátorem produkce ROS, jež se podílí na tvorbě aterosklerotického plátu a arteriálním zánětu. Na rozvoji aterosklerózy se také podílí hypertenze a vysoká hladina glukózy v krvi. Vzhledem k těmto skutečnostem byla zkoumána možnost zapojení UCP2 v prevenci rozvoje aterosklerózy. Blanc a spol. (2003) pozorovali, že UCP2 $-/-$ myši oproti UCP2 $+/+$ myším měly výrazně zvýšenou velikost a sníženou stabilitu aterosklerotické léze v hrudní aortě a aortálním sinu z důvodu zvýšeného oxidačního stresu (Nübel a Ricquier, 2006; Emre a Nübel, 2010). Zvýšená exprese UCP2 v cévních buňkách je potenciálně preventivním nástrojem působícím proti rozvoji a progresi aterosklerózy u pacientů s diabetem a hypertenzí zejména díky snížení produkce ROS v buňkách, resp. mitochondriích (Rousset et al., 2004; Nübel a Ricquier, 2006).

Expresa UCP2 v mozku a prodloužené míše byla zvýšena u stárnoucích potkanů (Mattiasson a Sullivan, 2006), ale také v játrech, naopak nezměněna zůstala v srdeční svalovině (Barazzoni a Nair, 2001). To naznačuje, že UCP2 se podílí na stárnutí tkání,

ale přesná role musí být ještě objasněna. Přesto není překvapující, že zvýšená exprese UCP2 se svojí antioxidační rolí byla nalezena v tkáních s vysokou metabolickou aktivitou. Je ale otázkou, zda indukci zvýšené exprese UCP2 by se mohlo zpomalit stárnutí v různých tkáních (Mattiasson a Sullivan, 2006).

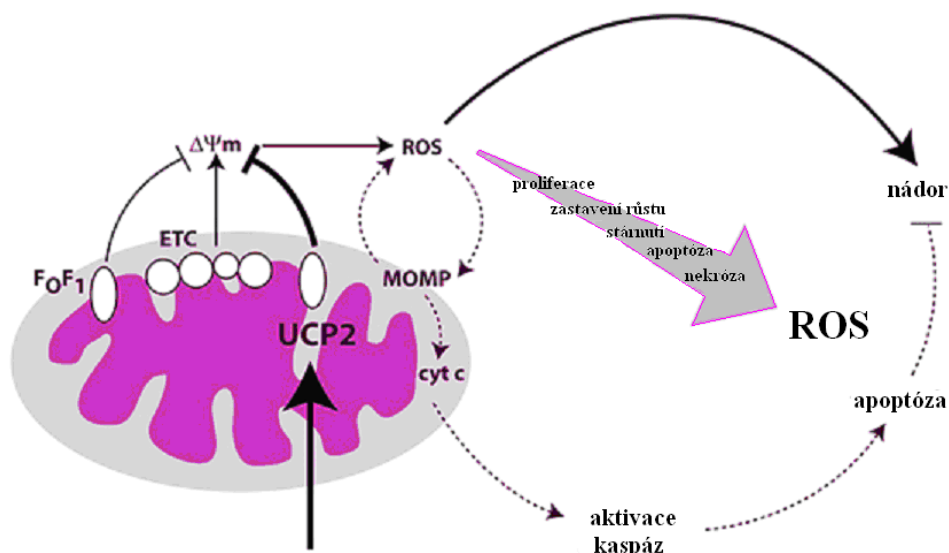
2.2.5.8. UCP2 a rakovina

Přežití maligně transformovaných buněk závisí na adaptivních mechanismech včetně modulace odpovědi na oxidační stres a získání lékové rezistence. Léková rezistence tumorových buněk je hlavním problémem v dosažení úspěšné protinádorové léčby. Navíc buňky rezistentní na léčbu exprimují vysoké hladiny mitochondriálního UCP2. Zvýšená exprese UCP2 se nachází u většiny nádorů tlustého střeva a míra exprese se zdá, že koreluje se stupněm neoplastických změn. Zvýšená exprese byla také prokázána v buňkách hepatokarcinomu, v aktivovaných myších buňkách myeloidní leukémie apod. Tyto nálezy mohou podporovat úvahu o roli UCP2 jako negativního regulátoru produkce ROS, která je součástí nové adaptivní odpovědi, pomocí které je modulován oxidační stres v nádorových buňkách. U skupiny vzácných nádorů štítné žlázy byla popsána up-regulace mRNA UCP2 a signifikantně nižší syntéza ATP z důvodu defektu spřažení oxidační fosforylace pravděpodobně způsobeném mitochondriální hyperplazií (Nübel a Ricquier, 2006).

Projevem nerovnováhy mezi energetickým příjmem a výdejem je kachexie u nádorů, která je způsobena zvýšeným mitochondriálním odpřažením. U různých zvířecích modelů kachexie byla pozorována zvýšená hladina mRNA UCP2 i UCP3. Mechanismus tohoto zvýšení však není doposud plně známý. Většina studií však ukazuje na efekt lipidy mobilizujícího faktoru (LMF), tzv. zinek- α 2-glykoproteinu. Tento 4 kDa velký protein je hojně přítomný v nádorech s kachexií a je spojován s indukci lipolýzy, která může zajišťovat mechanismus pro up-regulaci uncoupling proteinů. Lipolýza u těchto nádorů je spojena se sníženou hladinou malonyl-CoA, který inhibuje limitující kroky v β -oxidaci mastných kyselin. UCP2 podporuje oxidaci mastných kyselin, a tak spolupůsobí s LMF a vede k agresivnímu využití lipidů při kachexii. Nicméně kachexie je komplexní proces a neexistuje přímý důkaz, zda vyšší exprese UCP2 přispívá ke tkáňovému katabolizmu u nádorů (Baffy, 2010).

UCP2 exprese je také zvýšena u nádorů tlustého střeva u lidí, kde množství UCP2 koreluje se stupněm neoplastických změn v tlustém střevě (Baffy, 2010). Míra exprese

byla také signifikantně vyšší u pacientů s rakovinou tlustého střeva v klinickém stádiu III a IV než u stádia I a II (Kuai et al., 2010). UCP2 se zřídka detekuje v hyperplastických polypech (11,1 %), naopak stále více je přítomen v tubulárních adenomech (58,8 %) a adenokarcinomech tlustého střeva (86,0 %) (Baffy, 2010). Signifikantně vyšší UCP2 exprese se vyskytuje v nádorové tkáni tlustého střeva než v okolní tkáni a UCP2 tak může hrát roli v transformaci intestinálních epiteliálních buněk z benigních na maligní (Kuai et al., 2010). Zatímco je UCP2 protein v normálních játrech nedetekovatelný nebo pouze mírně (14,3 %), oproti tomu je stále více přítomný v hepatocelulárním karcinomu (33,3 %) a vysoce, ale rovnoměrně exprimován v cholangiokarcinomu. Obzvláště vysoká exprese UCP2 byla zjištěna také u oxyfilních nádorů štítné žlázy (Baffy, 2010).

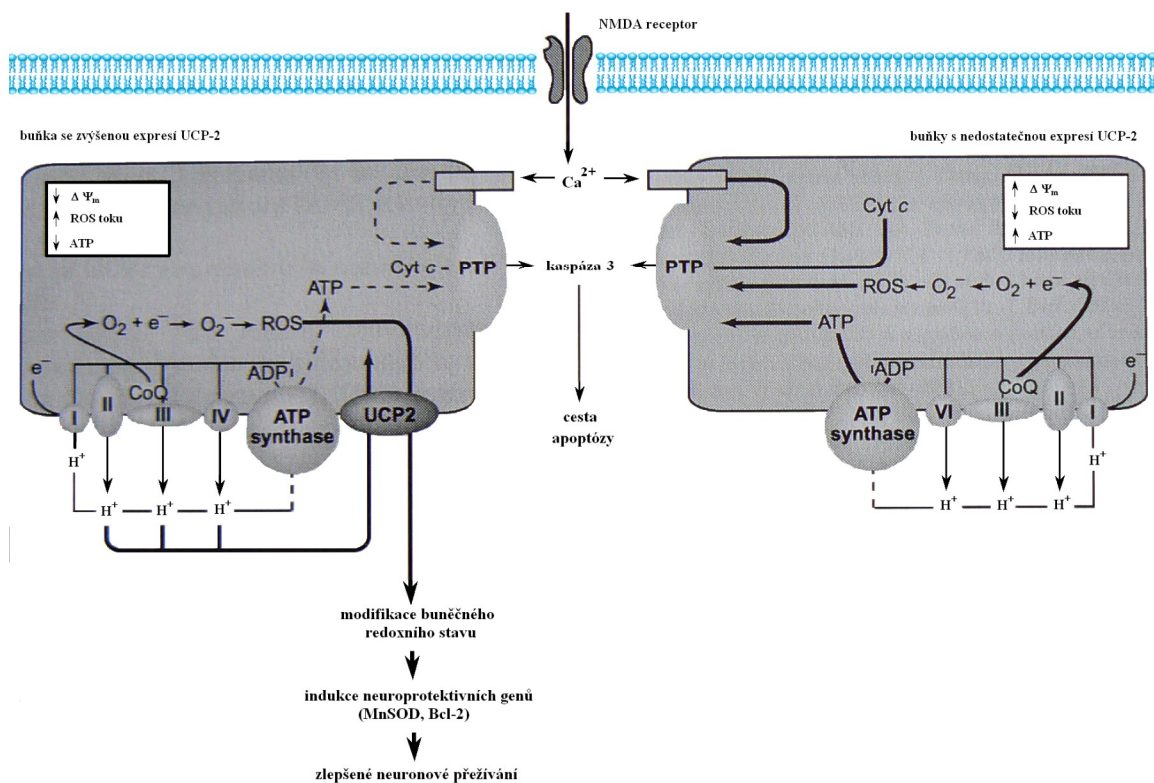


Obr. č. 15: Hypotetický model vztahu mezi UCP2 a karcinogenezí. Buněčná smrt je asociována s produkcí kyslíkových radikálů (ROS) a zahrnuje takové extrémy jako autonomní proliferaci a destrukci buněk. Tvorba nádoru se normálně kompenzuje apoptózou, ve které permeabilita vnější mitochondriální membrány (MOMP) zprostředkovaná ROS je často otázkou nezvratnosti, vedoucí k uvolnění cytochromu *c* do cytosolu a aktivaci kaskády kaspáz. Mitochondrie vytváří mnoho intracelulárního ROS, kdy je tento proces velmi citlivý ke změnám mitochondriálního membránového potenciálu. Apoptóza se často iniciuje nárazovým přísunem ROS, který vychází z časného zvýšení potenciálu. UCP2 může v zásadě zmírnit tuto krátkou mitochondriální hyperpolarizaci. Proto dokonce mírná změna potenciálu by mohla modulovat apoptózu a vychýlit tak rovnováhu účinků ROS směrem k tvorbě nádorů. Tento model může být platný také u nealkoholické steatózy (NAFLD, z angl. non-

alcoholic fatty liver disease), kde dlouhodobé zvýšení exprese UCP2 v hepatocytech by mohlo přispívat k rozvoji nádoru jater. *Převzato z Baffy, 2005.*

2.2.5.9. UCP2 a neuroprotektce

UCP2 může hrát důležitou roli při poranění mozku díky regulaci mitochondriálního potenciálu a energetické rovnováhy, neuroendokrinních a autonomních funkcí, produkce ROS a transportu mastných kyselin, buněčné smrti a zánětu. V mozku je UCP2 dominantně exprimován v mikroglíích, neutrofilech, monocytech, buňkách choroidního plexu a epiteliálních buňkách v některých částech předního, středního a zadního mozku. Z toho vyplývá, že mitochondrie jsou rozhodující orgány v regulaci buněčné smrti během mozkové ischemie, během níž vznikají superoxidové radikály a peroxid vodíku (Mehta a Li, 2009). Stále více důkazů naznačuje, že UCP2 by mohl být zapojen do procesů neuroprotektce, neboť UCP2 může zabránit buněčné smrti u ischemie mozku, akutního mozkového poškození. Tyto stavy vedou k nedostatku glukózy a kyslíku, což rychle redukuje množství syntetizovaného ATP v dýchacím řetězci, a tak vede k vyčerpání zasažené neuronální populace. Hlavním následkem tohoto energetického deficitu je depolarizace neuronů spojená s masivním uvolněním dráždivých aminokyselin, obzvláště glutamátu z presynaptických vezikulů do extracelulárního prostoru. To přispívá k excitotoxické neuronální buněčné smrti prostřednictvím zvýšené stimulace glutamátového receptoru jako například N-metyl-D-aspartátového receptoru (NMDA). Aktivace tohoto receptoru způsobuje masivní vstup vápenatých iontů, ale i sodných iontů do buňky. To je také spojeno s přítokem vody a chloridových iontů a odtokem draselných iontů, čímž dochází k porušení iontové homeostázy. Vápenaté ionty patří mezi nejobecnější signální elementy v neuronech a jsou důležité pro jejich život a fungování. Paradoxně ale dlouhodobě zvýšené hladiny intracelulárních Ca^{2+} iontů vedou k buněčné smrti, neboť spouští signalizační kaskádu v buňce a spolu s vyšší produkcí ROS vést až k neuronální buněčné smrti. Zvýšení těchto iontů je tedy klíčovou událostí při akutním mozkovém poškození a může přetrvávat až několik dní. Excitotoxická buněčná smrt je základním procesem odpovědným za mnoho neurodegenerativních chorob u lidí (Mattiasson et al., 2003; Paradis et al., 2003; Mattiasson a Sullivan, 2006).



Obr. č. 16: Možná role UCP2 v neuroprotekcii. Aktivace N-metyl-D-aspartátového receptoru (NMDA) vede k rychlému přísunu Ca²⁺. Zvýšená exprese UCP2 limituje Ca²⁺-pufrovací kapacitu mitochondrie redukcí mitochondriálního membránového potenciálu (ΔΨ_m) a zasahuje také do procesu přesunu ROS ven z mitochondriálního matrix, což modifikuje buněčný redoxní stav a aktivuje cytosolové neuroprotektivní geny. Odpráhující aktivita UCP2 může rovněž zrychlovat průběh elektronového transportu respiračním řetězcem, redukovat ROS produkci a ATP syntézu. Redukce mitochondriální koncentrace Ca²⁺, ROS a ATP snižuje mitochondriální permeabilitu, umožňující tok cytochromu c ven z mitochondrie prostřednictvím mitochondriálního póru přechodné permeability (MPTP, z angl. mitochondrial permeability transition pore), kde aktivuje kaspázy a vše vede až k aktivaci apoptózy. Naopak nedostatek UCP2 usnadňuje produkci ROS a ATP syntézu. *Převzato z Paradis et al., 2003.*

Mattiasson a spol. identifikovali mezi geny, které se indukují během ischemie také UCP2, neboť zjistili, že přežívání neuronů koreluje s jeho zvýšenou expresí. U transgenních myší s vyšší expresí UCP2 pozorovali po experimentálním navození cévní mozkové příhody a traumatického mozkového zranění menší poškození mozku a vyšší regeneraci. Navíc zjistili, že u těchto myší byla o jednu třetinu nižší velikost případného poškození. Také u kultivovaných neuronů zjistili, že UCP2 protein redukuje

buněčnou smrt a inhibuje aktivaci kaspázy-3 indukovanou nedostatkem kyslíku a glukózy (Mattiasson et al., 2003).

Po akutním mozkovém poškození dochází ke zvýšení hladin volných mastných kyselin, které zvyšují expresi UCP2. Tento protein depolarizuje mitochondriální membránu, což vede ke snížení přísunu Ca^{2+} a produkce ROS, snížení pravděpodobnosti mitochondriální propustnosti, aktivace kaspázy-3 a buněčné smrti. UCP2 navíc aktivuje transkripční faktory (např. NF- κ B, AP1) a tím neuroprotektivní geny jako MnSOD a Bcl-2 (Mattiasson a Sullivan, 2006).

2.2.6. Možnosti ovlivnění exprese UCP2

2.2.6.1. Hladovění a obezita

Při energetickém deficitu, tedy hladovění, se pravděpodobně díky omezené tvorbě tepla snižuje aktivita sympatického nervového systému, a tím i klidový energetický výdej. Nedostatek energie se tak omezuje potlačením termogenních mechanismů, což vede ke zvýšení energetické účinnosti (Mikulová a Hainer, 2001). Z tohoto důvodu byla u hlodavců zjištěna snížená exprese UCP1 v hnědé tukové tkáni (64% inhibice), ale v případě UCP2 nebyla ani po 48-hodinovém hladovění zjištěna změna exprese v BAT a srdeční tkáni. Naopak výrazné zvýšení exprese UCP2 probíhá při hladovění v kosterní svalovině (Boss et al., 1997 A) a po realimentaci se nadměrná exprese UCP2 snižuje až pod normální hodnoty (Schrauwen et al., 1999; Mikulová a Hainer, 2001). Také Millet a spol. pozorovali u lidí po pětidenní hypokalorické dietě (1045 kJ/den) 2 až 2,5-násobné zvýšení mRNA UCP2 v abdominální bílé tukové tkáni a kosterní svalovině. Navíc také zjistili pozitivní korelaci mezi hladinou mRNA UCP2 v tukové tkáni a BMI (Millet et al., 1997).

Tento překvapující jev lze vysvětlit na molekulární úrovni změnami v koncentraci volných mastných kyselin, které jsou hlavními induktory UCP prostřednictvím receptorů aktivovaných peroxizomovými proliferátory (PPAR). Hladovění snižuje aktivitu sympatiku, což v BAT vede ke snížení aktivity lipolytických enzymů, a tedy ke snížení hladiny intracelulárních mastných kyselin. Exprese UCP (zejména UCP3) se proto snižuje. Naopak v buňkách kosterní svaloviny koncentrace volných mastných kyselin závisí na jejich koncentraci v plazmě. Během hladovění dochází ke snížení

koncentrace inzulínu v plazmě, zvyšuje se rychlost lipolýzy a oxidace mastných kyselin, vzrůstá i koncentrace volných mastných kyselin v plazmě (Fleury a Sanchis, 1999; Schrauwen et al., 1999; Mikulová a Hainer, 2001).

Hladina mRNA UCP2 v bílé tukové tkáni u myši rezistentních k obezitě je vyšší než u myši náchylných k obezitě. Kromě toho, při vysokém podílu tuku v potravě došlo u prvního druhu myši ke zvýšení exprese UCP2, zatímco u druhého nikoliv (Fleury et al., 1997). Také u myši krmených rybím olejem oproti myším krmených převážně sacharidy dochází ke zvýšení hladiny mRNA UCP2 v játrech. Všechna tato zjištění naznačují, že se UCP2 může podílet na vývoji obezity (Tsuboyama-Kasaoka et al., 1999).

2.2.6.2. Chlad

Vystavení chladu způsobuje zvýšení energetického výdeje, za což je odpovědný UCP1 protein. Jeho zvýšení vede k většímu uvolnění energie ve formě tepla, čímž dochází k regulaci tělesné teploty (hlavní funkce UCP1). Proto se předpokládalo, že chlad reguluje také expresi dalších uncoupling proteinů (Schrauwen et al., 1999).

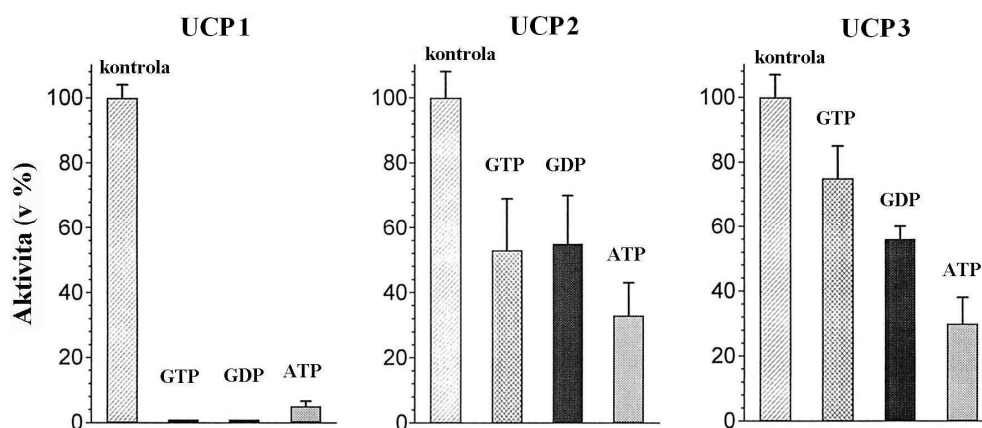
Fleury a spol. ve své studii pozorovali, že u myši vystavených 4 °C po dobu 10 dnů nedochází ke zvýšení exprese UCP2 v hnědé a bílé tukové tkáni, kosterní svalovině, ani v játrech (Fleury et al., 1997). Naopak Boss a spol. zjistili, že mRNA UCP1 a UCP2 je up-regulována v hnědé tukové tkáni (2,5×), kosterní svalovině a srdci (4,3×) potkanů po 48-hodinové expozici chladu při 6 °C (Boss et al. 1997 A).

Myši s knock-outem UCP1 jsou citlivé na chlad. Po vystavení nízkým teplotám (5 °C) nejsou schopné udržet tělesnou teplotu a hynou, přestože v hnědé tukové tkáni těchto myši dochází k mimořádně vysoké 5-násobné expresi UCP2 (Enerbäck et al., 1997). To naznačuje, že se zřejmě jedná o určitý mechanismus kompenzace, který však nestačí v nahrazení funkce UCP1, a tím udržení tělesné teploty. UCP2 v chladném prostředí nijak významně nepřispívá k tvorbě tepla (Enerbäck et al., 1997; Matthias et al., 1999). Většina autorů se tedy přiklání k názoru, že UCP2 se regulace tělesné teploty neúčastní (Mikulová a Hainer, 2001).

2.2.6.3. Nukleotidy

Transport protonů pomocí uncoupling proteinů může být inhibován purinovými nukleotidy (Sluse et al., 2006). Tri- a di-fosfáty purinových nukleotidů (GTP, GDP, ATP a ADP) se váží na UCP na cytosolové straně vnitřní mitochondriální membrány s vysokou afinitou a indukují tak konformační změny proteinu, který není schopen transportu protonů. V cytosolu se pohybuje ATP a ADP v milimolárních koncentracích, které by teoreticky mohly dostatečně inhibovat UCP. Nicméně většina cytosolového ATP a ADP je ve formě hořčnatého komplexu a pouze velmi malá část volných nukleotidů se může vázat na UCP. Navíc možnost vazby je silně závislá na pH, kdy se afinita snižuje se zvyšujícím se pH (Boss et al., 2000; Ricquier a Bouillaud, 2000 B).

Jabůrek a spol. ve svých experimentech zjistili překvapivé rozdíly v inhibici jednotlivých UCP pomocí purinových nukleotidů ATP, GTP a GDP o koncentraci 1 mmol/l a pH 7,2 (obr. č. 17). Nejvyšší míru inhibice aktivity UCP2 způsobuje ATP, zatímco GTP a GDP jsou významně slabšími inhibitory. V případě UCP1 jsou GTP a GDP o něco silnějšími inhibitory než ATP (Jabůrek et al., 1999). Monofosfáty GMP a AMP jsou slabými ligandy, které se váží s více než 50× nižší afinitou (Klingenberg a Echtay, 2001).



Obr. č. 17: Aktivita jednotlivých uncoupling proteinů (UCP1 až UCP3) po ovlivnění nukleotidy ATP, GTP a GDP při pH 7,2. Převzato z Jabůrek et al., 1999.

2.2.6.4. Inzulín

Sekrece inzulínu je řízena množstvím glukózy vstupující do β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. Zvýšená exprese mRNA UCP2 v pankreatických

ostrůvcích potkanů nebo klonovaných β -buněk tlumí glukózou stimulovanou sekreci inzulínu a snižuje množství buněčného ATP (Chan et al., 2001). UCP2 deficientní myši mají vyšší hladiny ATP v ostrůvcích a zvýšenou sekreci inzulínu navozenou glukózou, což ukazuje, že není přítomno odpřažení respirace. Toto zjištění potvrzuje hypotézu, že UCP2 je negativním regulátorem inzulínové sekrece, tj. (Zhang et al., 2001).

Také obsah lipidů v pankreatických β -buňkách musí být opatrně regulován tak, aby docházelo k optimální sekreci inzulínu. Glukózou stimulovaná sekrece inzulínu neprobíhá v pankreatických ostrůvcích, které nemají přísun triacylglycerolů, zatímco toxická akumulace lipidů je předpokládaným mechanismem poškození β -buněk u Zucker diabetických tukových, tzv. ZDF potkanů (Saleh et al., 2002). Také dlouhodobé působení volných mastných kyselin na β -buňky *in vitro* sice zvyšuje bazální hladinu inzulínu uvolňovaného β -buňkami, přesto ale jejich sekreční odpověď na okamžité působení glukózy je silně utlumena (Prentki a Corkey, 1996). U buněk vystavených dlouhodobému působení volných mastných kyselin byl redukován mitochondriální membránový potenciál a také amplituda glukózou-indukované hyperpolarizace, což odpovídá částečně odpřažené respiraci způsobené přítomností a/nebo aktivací UCP2 (Chan et al., 2001; Lameloise et al., 2001).

V rámci léčby diabetu je žádoucí snížení UCP2 proteinu v pankreatu, ale v jiných tkáních jako kosterní svalovina a bílá tuková tkáň je snížení nežádoucí, neboť může být spojeno s rizikem obezity. Proto byla vyslovena hypotéza, že obezita je považována za hlavní rizikový faktor pro vznik diabetes mellitus 2. typu, a to díky nadměrné aktivaci UCP2 volnými mastnými kyselinami (Schrauwen a Hesselink, 2002). Tuto hypotézu potvrzuje i zjištění, že po expozici oleátu v β -buňkách vzrůstá množství mRNA UCP2, tj. zvyšuje se odpřažení, snižuje se glukózou stimulovaná sekrece inzulínu a mitochondriální membránový potenciál (Lameloise et al., 2001). Vzhledem k tomu, že UCP2 reguluje tvorbu ROS, proto nadměrné snížení tohoto proteinu může vést ke zvýšené produkci ROS, která je při diabetu velmi nebezpečná (Schrauwen a Hesselink, 2002).

2.2.6.5. Mastné kyseliny a PPAR

Regulace UCP2 exprese mastnými kyselinami (FFA, z angl. free fatty acid) nastává prostřednictvím přímé interakce mastných kyselin s UCP2 promotorovou oblastí, kde se nachází v 50-upstream regulační oblasti (50-USR) UCP2 genu několik regionů, které

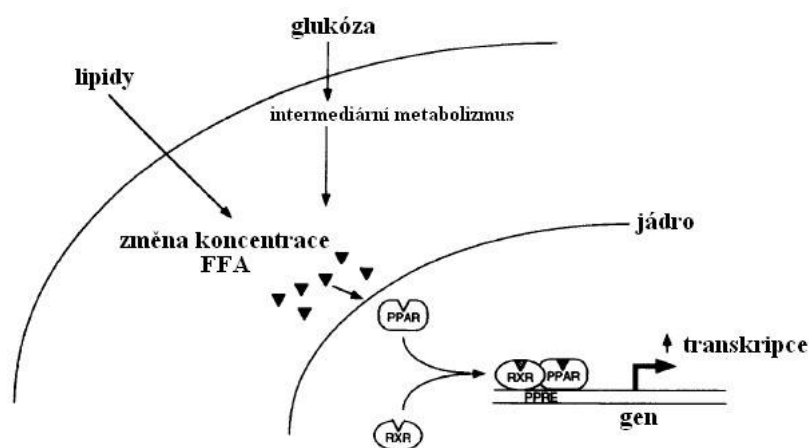
poskytují FFA citlivost. Jestliže mastné kyseliny působí prostřednictvím PPAR nebo SREBP-1c (z angl. sterol regulatory element binding protein), poté vazebné místo pro tyto faktory lze očekávat právě v této oblasti. Bylo zjištěno, že se tato vazebná místa skládají z jednoho Sp1 místa (předpokládaného SRE motivu) a dvou E-box motivů. Mutace v SRE místě nebo také v E-box motivech eliminuje odpověď UCP2 promotoru k FFA. Zvýšená exprese SREBP-1c v pankreatických β -buňkách vede k vyšší expresi UCP2 (Mattiasson a Sullivan, 2006).

Mastné kyseliny také indukují transkripci skupiny genů zapojených do oxidace lipidů v játrech a tukové tkáni tím, že působí jako ligandy pro PPAR. Mezi takovéto geny patří i UCP2, to znamená, že zvýšená exprese UCP2 může potenciálně zvyšovat oxidaci FFA. Nenasycené mastné kyseliny indukující UCP2 mohou působit jako ligandy, ale také jako aktivátory PPAR (Mattiasson a Sullivan, 2006). PPAR jsou transkripční faktory patřící do rodiny nukleárních receptorů. K jejich aktivaci dochází navázáním látek s transkripčním účinkem, tzv. PPAR agonistů, mezi které patří některé typy mastných kyselin, fibráty, thiazolidindiony. Aktivovaný PPAR vytváří heterodimer s retinoidním nukleárním receptorem X (RXR), který se naváže na specifické úseky DNA, tzv. responsivní elementy pro peroxizomové proliferátory (PPRE). Tato vazba pak vede k aktivaci transkripce specifických genů s následnou syntézou příslušných proteinů (Straková et al., 2005; Anderlová et al., 2006). PPAR se vyskytuje ve třech izoformách – PPAR- α , - β (někdy označován PPAR- δ) a - γ . Jednotlivé PPAR jsou kódovány různými geny a vyznačují se tkáňovou specifitou (Straková et al., 2005). PPAR- α se nachází především v jaterní a svalové tkáni, kde se podílí na regulaci oxidace FFA, resp. na jejich katabolizmu. PPAR- γ se vyskytují v tukové tkáni a jsou významným regulátorem její diferenciaci, kapacity k ukládání triacylglycerolů (regulují anabolizmus lipidů) a nepřímo i endokrinní funkce (Schoonjans et al., 1996; Straková et al., 2005). PPAR- γ se však nachází i ve svalové a jaterní tkáni (Anderlová et al., 2006). PPAR- β se nachází ve svalech (Chevillotte et al., 2001; Mattiasson a Sullivan, 2006).

Přirozenými ligandy PPAR- α jsou esenciální mastné kyseliny (arachidonová, linoleová, linolová kyselina) a kyseliny palmitová, stearová, olejová, také některé eikosanoidy (prostaglandin A₂, leukotrien B₄ a další). Mezi ligandy pro PPAR- γ patří polynenasycené mastné kyseliny a jejich deriváty (např. 13-hydroxyoktadekadenová kyselina, 15-hydroxyeikosatetraenová kyselina a další) a pro PPAR- β prostacykliny

(Straková et al., 2005). Mastné kyseliny mohou působit přímo na PPAR nebo mohou sloužit jako prekurzory pro biosyntézu PPAR ligandů s větší afinitou (Ježek, 2002).

V bílé tukové tkáni a v buňkách kosterní svaloviny zvyšuje kyselina linoleová transkripci UCP2 (Camirand et al., 1998). U myši krmených rybím tukem, který obsahuje ω -3 polynenasycené mastné kyseliny, se zvýšila prostřednictvím PPAR- α mRNA UCP2 v játrech (Tsuboyama-Kasaoka et al., 1999) a prostřednictvím PPAR- γ v tenkém střevě (Murase et al., 2001) a v bílé tukové tkáni (Hun et al., 1999).



Obr. č. 18: Schéma aktivace PPAR signalizační dráhy na lipidový a glukózový podnět. Převzato z Schoonjans et al., 1996.

Alternativní cestou regulace exprese UCP2 pomocí mastných kyselin je SREBP patřící mezi transkripční faktory známé svou rolí v regulaci lipidového metabolismu (Horton et al., 2002). SREBP1 indukuje expresi genů zahrnutých v syntéze lipidů v játrech a tukové tkáni. Polynenasycené mastné kyseliny (ω -3 i ω -6) snižují expresi mRNA SREBP1 a snižují hladinu proteolytického fragmentu SREBP1, který vstupuje do jádra jako aktivní transkripční faktor, a tak snižuje schopnost SREBP1 aktivovat transkripci SREBP1-responsivních lipogenních genů v játrech, tzn. inhibují *de novo* lipogenezi v játrech (Mater et al., 1999).

2.2.6.6. *Leptin*

Peptidový hormon leptin se tvoří převážně adipocyty, ale také placentou, buňkami žaludeční sliznice, makrofágy, buňkami pankreatických ostrůvků atd. (Lee et al., 1999 A; Mikulová a Hainer, 2001; Ježek, 2002). Jeho plazmatická koncentrace koreluje s celkovým množstvím tuku v organismu, to znamená, že je vyšší u obézních osob, kde

je vyšší podíl volného leptinu a leptinová rezistence. Leptin hraje důležitou funkci v regulaci metabolismu lipidů, neboť se přenáší krví do hypotalamu, kde se váže na specifický Ob-receptor b (Ob-Rb), který umožňuje aktivaci buněčných signálů a snižuje tak chuť k jídlu (příjem potravy) a zároveň zvyšuje energetický výdej (Cusin et al., 1998; Shimizu et al., 2007; Li, 2011).

Leptin zvyšuje transkripci jednotlivých UCP. Zhou a spol. ve svých pokusech zjistili, že 7-denní hyperleptinémie vede ke zvýšení exprese UCP2 v pankreatu a bílé tukové tkáni hlodavců, tedy v tkáních, které exprimují leptinový receptor Ob-R. Plná funkčnost tohoto receptoru je nezbytná, protože hyperleptinémie nezvyšuje mRNA UCP2 v bílé tukové tkáni u leptin-rezistentních obézních ZDF (*fa/fa*) potkanů (Zhou et al., 1997). Hyperleptinémie však nemá žádný efekt na jiné tkáně jako játra, kosterní svalstvo a hnědou tukovou tkáň (Cusin et al., 1998). Snížená úroveň exprese UCP2 byla pozorována v makrofázích myši s mutovaným genem pro leptin (tzv. ob gen), neboť vzniklý protein je poškozený a není rozpoznáván leptinovými receptory. Díky tomu dochází k hyperfagii, navození nízké úrovně metabolismu a ukládání tuku, tedy k rozvoji obezity, která bývá často spojena i s inzulínovou rezistencí (Zhou et al., 1997; Lee et al., 1999 A).

2.2.6.7. *Hormony štítné žlázy*

Štítná žláza představuje v organismu endokrinní žlázu, která produkuje především L-tyroxin (T_4). Jednotlivé etapy jeho biosyntézy je možné stručně shrnout následovně: 1. vychytávání jodidu z krve aktivním transportním systémem, tzv. jodidovou pumpou, 2. oxidace jodidu na molekulární jód, působením systému peroxidáz, 3. vazba molekulárního jódu na aminokyselinu tyrozin, 4. vzájemná kondenzace jodovaných aminokyselin, dvou molekul dijodtyrozinu (DIT) na tyroxin, resp. monojodtyrozinu (MIT) a DIT na 3,5,3'-trijodtyronin (T_3). Jodované sloučeniny jsou v štítné žláze vázány na tyreoglobulin – protein přítomný v koloidu folikulárních acinů. Posledním stupněm biosyntézy je proteolytické odštěpení hormonů štítné žlázy od tyreoglobulinu a jejich uvolnění do krevního oběhu, kde se T_4 váže na specifické (globulin vážící tyroxin, TBG) a nespecifické (albumin) plazmatické transportní proteiny (Ganong, 1995; Murray et al., 1998).

Tyroxin je hlavní cirkulující produkt této žlázy, ale aktivnějším hormonem v buňkách je trijodtyronin (Murray et al., 1998). V lidském krevním séru se celkový T_4

nachází v koncentracích 55-160 nmol/l, volný T_4 je v koncentracích 10-26 pmol/l. Trijodtyronin se nachází koncentraci 1,5-3,0 nmol/l a volný T_3 v koncentraci 3,8-9,2 pmol/l (Schäffler, 1993).

Hormony štítné žlázy jsou lipofilní molekuly, které difundují plazmatickou membránou všech buněk, ale své vysoko afinitní specifické receptory nacházejí jenom v jádře cílových buněk. Většina T_4 je po vstupu do cílových buněk deiodována na T_3 a reverzní T_3 (r T_3 , 3,3',5'-trijodtyronin). T_3 se váže asi s desetkrát vyšší afinitou než T_4 a má tomu úměrně vyšší biologickou aktivitu (Murray et al., 1998; Kelly, 2000).

Tyroidní hormony se projevují důkladným efektem na energetický metabolismus, ale mechanismus jejich působení není úplně znám (Goglia et al., 1999). Další účinek je na spotřebu kyslíku (Müller a Seitz, 1994), neboť je známo, že hepatocyty izolované z potkanů s hypothyreózou dýchají pomaleji než hepatocyty kontrolních zvířat a naopak hepatocyty z potkanů, u kterých se je navozena hypertyreóza, dýchají rychleji (Harper a Brand, 1993).

Působení tyroidních hormonů indukuje *in vivo* snížení cytosolárního redoxního potenciálu v játrech se současným zvýšením jaterní oxidační kapacity. Snížení redoxního potenciálu je ještě doprovázeno snížením mitochondriálního fosfátového potenciálu (Kalderon et al., 1992).

Mnoho fyziologických účinků trijodtyroninu se v buňkách uplatňuje na úrovni transkripce, kdy se T_3 váže na specifické jaderné receptory určené pro hormony štítné žlázy (Nedergaard et al., 2001). Tím dochází ke stimulaci nebo inhibici exprese specifických genů, což vede ke zvýšení katabolických nebo snížení anabolických enzymů (Kadenbach, 2003). Geny pro uncoupling proteiny patří mezi omezený počet genů regulovaných přímo hormony štítné žlázy.

T_3 stimuluje mRNA UCP2 v různých tkáních a způsobuje orgánově specifická zvýšení exprese UCP2 u potkanů (Lanni et al., 1997; Masaki et al., 1997). Masaki a spol. podávali potkanům 7 dní infuzi T_3 , čímž navodili u potkanů hypertyreózu, a pozorovali, že potkani oproti kontrolním ztráceli váhu (Masaki et al. 1997). Stimulační efekt na mRNA UCP2 se zjistil také po týdenní aplikaci T_3 u srdeční tkáně a kosterní svaloviny potkanů, ale ne u ledvin a jater (Lanni, et al., 1997). Zvýšenou expresi UCP2 a mRNA UCP3 po stimulaci T_3 pozorovali také Barbe a spol. v kosterní svalovině a tukové tkáni u lidí (Barbe et al., 2001). Voci a spol. ve svých pokusech zjistili, že úroveň exprese UCP2 v Kupfferových buňkách byla působením T_3 zřetelně ovlivněna. Konečný účinek však závisel na délce doby aplikace T_3 eutyroidním potkanům (Voci et

al., 2001). Přestože je vliv trijodtyroninu na expresi UCP2 znám, doposud se žádné studie nezabývaly zjištěním kinetiky exprese mRNA UCP2 v časných hodinách po aplikaci hormonu. Proto jsme se v naší práci rozhodli pomocí real-time PCR zjistit množství mRNA UCP2 v prvních 24 hodinách, tj. 1, 3, 6, 12 a 24 po aplikaci trijodtyroninu.

Hyperfunkce štítné žlázy se tedy projevuje nárůstem exprese UCP2 ve svalu, hnědé a bílé tukové tkáni a v srdci. Zvýšená exprese UCPs by tak mohla na molekulární úrovni vysvětlit charakteristický průvodní znak nadprodukce těchto hormonů – nadměrnou tvorbu tepla (Mikulová a Hainer, 2001). Přesný účinek T_3 na hladiny mRNA UCP2 v různých tkáních zatím stále není vyřešen a je předmětem dalšího zkoumání.

2.2.6.7.1. *Jaderné receptory pro trijodtyronin*

Efekty T_3 jsou na genomové úrovni zprostředkovány jaderným trijodtyroninovým receptorem (TR), který je transkripčním faktorem (Filipčík et al., 1998; Goglia et al., 1999). Tento receptor je součástí euchromatinu a je lokalizován v intranukleozómové oblasti chromozomu (Glass a Holloway, 1990). TR má povahu kyselých nehistonových proteinů o molekulové hmotnosti v rozmezí od 47 do 57 kDa (Casanova et al., 1984), které jsou lehce extrahovatelné z jader buněk v prostředí o vyšší iontové síle (Ichikawa et al., 1989).

TR je kódován c-erbA protoonkogenem (opačná část virového v-erbA onkogenu), který zajišťuje vysokou afinitu TR k T_3 (Goglia et al., 1999). V současné době jsou známy dva geny, c-erbA α (TR α) a c-erbA β (TR β), kódující několik izoform tyroidního receptoru. Gen TR α kóduje $\alpha 1$ formu receptoru pro T_3 (TR $\alpha 1$) a jeho receptorové varianty – TR $\alpha 2$, TR $\alpha 3$ a reverzní formu receptoru α (Rev-erbA α) a je lokalizován na lidském chromozomu 17 (Thompson et al., 1987). Pouze TR $\alpha 1$ je skutečným představitelem receptoru pro T_3 . Ostatní TR se vyznačují tím, že nejsou schopny specificky vázat T_3 (Goglia et al., 1999).

Druhým typem plně funkčních receptorů pro T_3 jsou β -receptory - TR $\beta 1$ a TR $\beta 2$, které jsou kódovány genem lokalizovaným na lidském chromozomu 3 (Weinberger et al., 1986).

Jaderné receptory TR $\alpha 1$ a TR $\beta 1$ byly identifikovány ve všech tkáních (Lazar, 1993), avšak přítomnost TR $\beta 2$ byla dokázána pouze v přední hypofýze (Hodin et al., 1989) a

v některých strukturách hypotalamu (Cook et al., 1992). Jaká je úloha TR α 2, který není schopný vázat T₃, a přesto se nachází v relativně vysoké koncentraci v mozku, není dodnes vyjasněné (Muñoz a Bernal, 1997; Kumar a Thompson, 1999).

Společným strukturním znakem jadrových receptorů pro T₃ je existence čtyřech funkčních domén na molekule receptoru. Ve směru od N-konce polypeptidu mají tyto domény označení A/B, C, D, E/F (Evans, 1988).

Doména A/B představuje velmi variabilní oblast molekuly TR z hlediska délky a sekvence aminokyselin. Předpokládá se, že tato doména má význam při aktivaci procesu transkripce. Je taky pravděpodobné, že je funkčně zodpovědná za interakce typu protein-protein mezi molekulou receptoru a jinými regulačními proteiny, které tvoří vazbu s DNA (Apriletti et al., 1998).

Doména C obsahuje 10 až 11 molekul cysteinu, které v přítomnosti iontů zinku umožňují vytvoření koordinačního komplexu úseku molekuly receptoru, přičemž dojde k vytvoření dvou tzv. zinkových prstů, důležitých pro vazbu molekuly receptoru na DNA. Na prvním zinkovém prstě se nachází tzv. P-box, který je tvořen třemi aminokyselinami, a na druhém je tzv. D-box, který má pět aminokyselin. Oba uvedené boxy mají význam pro specifické rozpoznání primární sekvence nukleotidů a struktury HRE (hormon responsivní element) cílových genů (Umesono a Evans, 1989; Glass a Holloway, 1990).

Doména D je funkčně zodpovědná za realizaci sekundární a terciární struktury molekuly receptoru. Sekundární struktura této domény je velmi flexibilní a v konečném důsledku tvoří pasivní spojení domény C a E (Ichikawa a Hashizume, 1995).

Doménu E/F představuje úsek molekuly TR, který je zodpovědný za specifickou vazbu hormonu štítné žlázy na receptor.

2.2.6.7.2. *Mitochondriální vazebná místa pro trijodtyronin*

Vysoce afinitní vazebná místa pro T₃ byla identifikována ve vnitřní mitochondriální membráně v roce 1975 Sterlingem a spolupracovníky. Nedávné studie Cabella a spol. ukázaly existenci dvou T₃ vazajících proteinů v mitochondriálních extraktech jater krys. První protein (43 kDa) byl lokalizován v matrix a další (28 kDa) ve vnitřní mitochondriální membráně (Goglia et al., 1999).

Mitochondrie mohou být důležitým přímým cílem pro T₃, třebaže možné zapojení proteinu o velikosti 43 kDa v účinku na energetický metabolismus nebylo důkladně

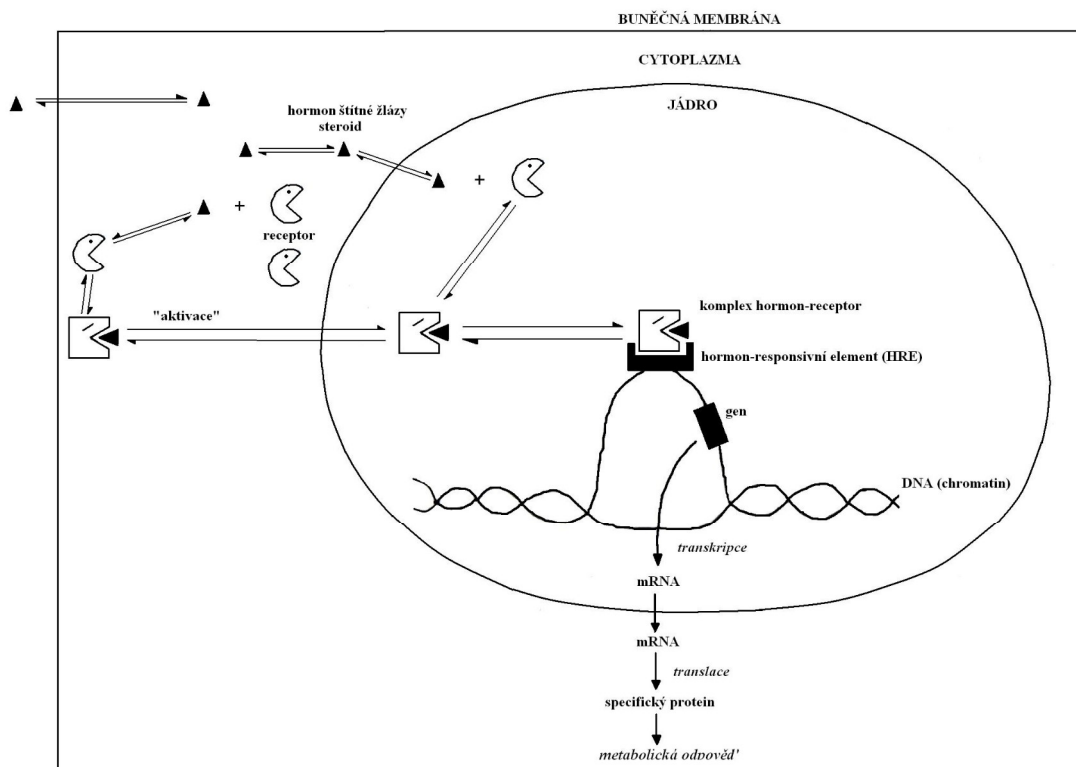
prozkoumáno. To nevylučuje možnost, že mitochondriální vazebná místa pro T_3 mohou hrát důležitou fyziologickou roli v regulaci mitochondriálního transkripčního aparátu. To je přijatelné ze dvou důvodů: 1. T_3 ovlivňuje mitochondriální biogenezi a přeměnu, 2. mitochondriální biogeneze a přeměna potřebují koordinované zapojení jaderného a mitochondriálního genetického aparátu (Goglia et al., 1999).

2.2.6.7.3. *Stimulace transkripce tyroidními hormony*

Hormony štítné žlázy nejprve proniknou do buňky, kde se navážou na své intracelulární receptory. Komplex hormon-receptor pak prochází „aktivační“ reakcí závisící na teplotě a přítomnosti solí. Aktivační reakce vede ke změnám velikosti, konformace a povrchového napětí, které komplex hormon-receptor činí schopným navázat se na chromatin. Komplex hormon-receptor se váže na specifickou oblast DNA, zvanou všeobecně HRE, hormon responsivní element (Murray et al., 1998). Stimulace UCP genu hormony štítné žlázy probíhá u potkanů prostřednictvím dvou TRE (z angl. thyroid hormone response element), které jsou od sebe odděleny pouze 27 bp (Rabelo et al., 1996). V každém případě vazba komplexu hormon-receptor na DNA zvyšuje transkripci mRNA kódovanou genem, na který se komplex váže. Mediátorová RNA je pak na ribozomech překládána s následnou produkcí zvýšeného množství proteinu, který ovlivňuje buněčnou funkci (Ganong, 1995).

Geny ovlivňované tyroidními hormony musí být v oblastech chromatinu, které jsou transkripčně aktivní. To je definováno jejich citlivostí vůči digesci enzymem, který štěpí DNA.

Aktivace nebo inhibice transkripce jaderného genu pomocí T_3 může být významná pro některé efekty, které T_3 vykonává na mitochondriální úrovni. Regulace funkce mitochondriální respirace pomocí T_3 může také vyplývat ze změn v expresi genů kódujících komponenty respiračního aparátu (respirační geny) nebo složky, které aktivují nebo inhibují mitochondriální genomový aparát. U savců je asi 100 genových produktů, které jsou hlavně kódovány v mitochondriálním genomu, nezbytných pro biogenezi respiračního aparátu (Goglia et al., 1999).



Obr. č. 19: Mechanismus působení hormonů štítné žlázy. Hormony se vážou na intracelulární receptory a to způsobuje změnu konformace receptoru. Komplex hormon-receptor se pak váže na specifickou oblast DNA, zvanou HRE (hormon responsivní element), a tato interakce vyvolá aktivaci nebo represi určitého počtu genů. *Převzato z Murray et al., 1998.*

2.3. Regenerace jater

Játra jsou orgánem s unikátní schopností regulovat svůj růst a hmotnost jak u lidí, tak u zvířat. Tato vlastnost je obzvláště pozoruhodná, protože hepatocyty jsou buňky, které se za normálního stavu dělí výjimečně. Přesto jejich proliferační kapacita a schopnost přizpůsobit se variabilním metabolickým požadavkům zůstává zachována po celou dobu života. Tyto vlastnosti se velmi rychle projeví, když dojde k deficitu či nadbytku jaterní hmoty. Redukce jaterní tkáně může být způsobena chirurgickým odstraněním části jater (např. parciální hepatektomie u pacientů s ložiskovým postižením jater nebo při transplantaci jater, kdy štěp poskytuje živý dárcem), buněčnou ztrátou (např. funkčním deficitem bez ztráty hmoty, jaterní nekrózou) způsobenou xenobiotiky s hepatotoxickým účinkem (např. acetaminofen, tetrachlormetan, thioacetamid) nebo viry (např. virus hepatitidy B a C) (Fausto, 2000). Parciální

hepatektomie vedoucí k odstranění až 70 % jater se široce používá pro studium jaterní regenerace u experimentálních zvířat již od roku 1931, kdy Higgins a Anderson popsali tuto metodu (Higgins a Anderson, 1931).

Proces regenerace jater probíhá ve třech základních fázích. První je iniciace, kdy hepatocyty nacházející se v klidové G_0 fázi buněčného cyklu vstupují opakovaně do mitotického dělení. Řízení první fáze regenerace jater je většinou přisuzováno cytokinům-dependentní signalizační dráze. Poté následuje proliferační fáze charakterizovaná mitotickým dělením jaterních buněk, během níž se obnovuje jaterní parenchym prakticky do původní velikosti před poškozením. Hepatocyty dosahují S-fáze se začátkem zvýšení DNA syntézy 12 hodin po poškození a maximem okolo 24. hodiny. S-fáze v neparenchymových buňkách začíná později, u Kupfferových buněk a žlučových buněk 48 hodin po inzultu a u endoteliálních buněk dokonce až po 96 hodinách. Vše je ukončeno terminací růstu a precizní regulací výsledné velikosti jater, která plně odpovídá funkčním požadavkům organismu (Fausto, 2000; Taub, 2004; Fausto a Riehle, 2005). Původní velikost jater po 2/3 hepatektomii u potkana je obnovena po 7 až 14 dnech v závislosti na věku a stavu pokusných zvířat.

Genovou expresi v regenerujících se játrech je možné rozdělit také do několika fází. Krátce po chirurgickém zákroku dochází k expresi velkého množství tzv. bezprostředních časných genů (0 až 4 hodiny po parciální hepatektomii). Bezprostředně po PH (30 – 60 minut) dochází ke stimulaci neparenchymových buněk v játrech a ty produkují cytokiny, především tumor nekrotizující faktor alfa ($TNF\alpha$) a interleukin 6 (IL6). Tyto cytokiny jsou odpovědné za aktivaci transkripčních faktorů, které se uplatňují při řízení regenerace jater. Jsou to transkripční faktory $NF\kappa B$, STAT3, AP-1 a $C/EBP\beta$. Množství reaktivních kyslíkových radikálů a glutathionu může určovat, zda efekt TNF na hepatocyty bude proliferativní nebo apoptotický. Další významnou změnou po PH je rozsáhlá přeměna extracelulární matrix v játrech, která souvisí mimo jiné s aktivací urokinázového aktivátoru plasminogenu s následnou aktivací specifického růstového faktoru pro játra – HGF (z angl. hepatocyte growth factor). Přítomnost růstových faktorů je podmínkou progresu proliferačního děje. Exprese cyklinu D1 pravděpodobně nastolí stádium, ve kterém se replikace stane autonomní, tedy nezávislou na další přítomnosti růstových faktorů (Fausto, 2000).

3. Cíle práce

Hlavním cílem naší práce bylo studium indukce exprese mRNA uncoupling proteinu 2 v jaterní tkáni potkana. S ohledem na skutečnost, že hormony štítné žlázy vykazují významný účinek na energetický metabolismus, který může být zprostředkován kromě přímého efektu také indukcí genové exprese proteinů účastnících se metabolických pochodů, soustředili jsme se na sledování kinetiky exprese mRNA UCP2 v časných hodinách po aplikaci trijodtyroninu. Pro optimalizaci experimentálních podmínek jsme nejprve použili jako modelový systém genové indukce hormonu štítné žlázy mitochondriální glycerofosfátdehydrogenázu, u které lze na rozdíl od UCP2 hodnotit nejen expresi mRNA, ale také množství proteinu i jeho enzymovou aktivitu. Za takto definovaných podmínek jsme hodnotili kinetiku exprese mRNA UCP2.

V další části práce jsme ověřovali expresi mRNA UCP2 v jaterní tkáni potkana po parciální (2/3) hepatektomii. Jedná se o proliferační děj vyžadující značné množství energie, zároveň je však provázen zvýšenou tvorbou ROS. Případná zvýšená tvorba UCP2 by mohla být významným ochranným mechanismem proti oxidačnímu stresu.

V jednotlivých etapách naší práce jsme provedli:

1. studium vlivu jednorázového a opakovaného podání trijodtyroninu na biogenezi mitochondriální glycerofosfátdehydrogenázy
2. optimalizace metody pro stanovení exprese RNA UCP2
3. sledování exprese mRNA UCP2 v intervalech 1, 3, 6, 12 a 24 hodiny po i. p. aplikaci jedné resp. tří dávek trijodtyroninu
4. studium exprese mRNA UCP2 za 1, 3, 6, 12 a 24 hodiny po parciální hepatektomii.

4. Experimentální část

4.1. Materiál a metody

4.1.1. Pokusná zvířata, schémata experimentů a odběr vzorků

Všechny pokusy jsme prováděli na dospělých samcích laboratorního bílého potkana kmene Wistar (BioTest, Česká republika) o počáteční hmotnosti 200 až 250 g. Zvířata byla chována v klecích při 23 ± 1 °C, relativní vlhkosti 55 ± 10 %, výměně vzduchu 12 až 14× za hodinu a světelném režimu 12 hodin světla (6 až 18 hodin) a 12 hodin tmy s volným přístupem ke standardní laboratorní krmné směsi (ST-1, Velaz) a vodě. O všechna zvířata bylo pečováno podle metodických pokynů Odborné komise pro ochranu zvířat Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze. Pokusy byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání podle zákona č. 246/92 Sb. v platném znění, §17, 3c. při LF v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

V první části naší práce jsme se zaměřili na zjištění vlivu aplikace trijodtyroninu na biogenezi mitochondriální glycerofosfátdehydrogenázy (mGPDH) jako modelového systému, který nám umožní lépe navrhnout schéma pokusů pro následné studium exprese UCP2. Nejprve jsme prováděli analýzy mGPDH u potkanů, kterým byla aplikována jedna dávka trijodtyroninu, schéma pokusu je uvedeno v tabulce č. 2.

Tab. č. 2: Schéma jednotlivých skupin potkanů při sledování kinetiky mRNA mGPDH po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu (T_3).

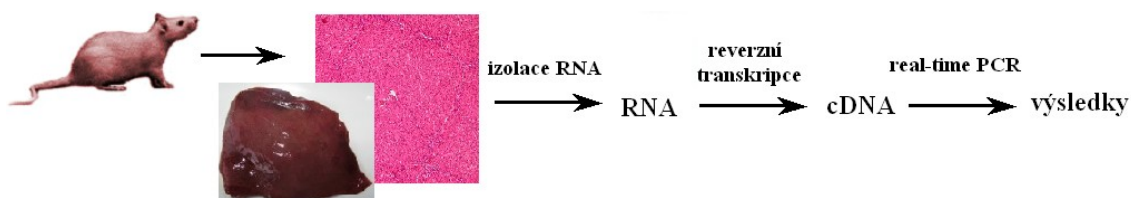
Skupina	<i>n</i>	Charakteristika skupiny
kontrolní	4	potkani usmrcení 3 hodiny po aplikaci jedné dávky fyziologického roztoku
T_3_{3h}	4	potkani usmrcení 3 hodiny po aplikaci jedné dávky T_3
T_3_{6h}	4	potkani usmrcení 6 hodin po aplikaci jedné dávky T_3
T_3_{12h}	4	potkani usmrcení 12 hodin po aplikaci jedné dávky T_3
T_3_{24h}	4	potkani usmrcení 24 hodin po aplikaci jedné dávky T_3
T_3_{72h}	4	potkani usmrcení 72 hodin po aplikaci jedné dávky T_3

Pozn.: n – celkový počet potkanů v jednotlivých skupinách.

V těchto pokusech jsme se zaměřili na stanovení enzymové aktivity mGPDH a ve spolupráci s oddělením Bioenergetiky Fyziologického ústavu Akademie věd také na analýzu exprese mRNA mGPDH pomocí northern blotu a množství proteinu pomocí western blotu.

V další části práce jsme potkanům podávali tři dávky trijodtyroninu ($3 \times 200 \mu\text{g/kg}$ tělesné hmotnosti). V tomto případě jsme potkany rozdělili pouze do tří skupin. První skupině (KO) byl po tři dny podáván fyziologický roztok a druhé skupině trijodtyronin ($3T_3_{24h}$). Obě tyto skupiny byly po 24 hodinách od poslední aplikace usmrceny. Třetí skupině ($3T_3_{72h}$) byl rovněž tři dny aplikován roztok trijodtyroninu, ale potkani byli usmrceni až po 72 hodinách od aplikace poslední dávky.

Schémata pokusů pro studium exprese UCP2 v játrech po aplikaci jedné a tří dávek trijodtyroninu a po parciální hepatektomii byla navržena až na základě výsledků modelového systému. Při sledování genové exprese je nutné, aby všechny vzorky byly odebírány ze stejného místa a zpracovány za stejných podmínek. Prováděli jsme proto stejný způsob izolace RNA, reverzní transkripce a real-time PCR se stejnými primery a sondami, také množství vstupující RNA do reverzní transkripce a cDNA do real-time PCR musí být vždy stejné (Huggett et al., 2005). Souhrnné schéma metodického postupu je uvedeno na obrázku č. 20.



Obr. č. 20: Metodický postup kvantifikace exprese mRNA UCP2.

První skupiny potkanů byly vždy kontrolní, neboť jim byl podáván pouze fyziologický roztok, dalším skupinám potkanů byl aplikován intraperitoneálně (i. p.) trijodtyronin, a to v jedné dávce ($1 \times 200 \mu\text{g/kg}$ tělesné hmotnosti) nebo ve třech dávkách ($3 \times 200 \mu\text{g/kg}$ tělesné hmotnosti). V případě tří dávek probíhala aplikace $1 \times$ denně vždy ve stejnou dobu. Příprava trijodtyroninu probíhala následujícím způsobem: 2 mg T_3 se rozpustily ve 2 ml 1 mol/l NaOH, přidalo se přibližně 30 ml aqua pro injectione (Braun, Německo) a pH se upravilo pomocí 1 mol/l HCl na hodnotu 7,4. Na závěr se objem doplnil na 50 ml rovněž pomocí aqua pro injectione. Potkanům bylo poté podáváno 0,5 ml čerstvě připraveného $T_3/100$ g tělesné hmotnosti. Jednotlivé

experimentální skupiny potkanů se mezi sebou lišily pouze časem usmrcení od aplikace T_3 . Zvířata byla usmrcena v éterové narkóze exsanquinací z bifurkace břišní aorty. Získaná krev byla použita pro stanovení sérové koncentrace celkového a volného trijodtyroninu. Potkanům byla po usmrcení chirurgicky vyjmuta játra (průměrná hmotnost $9,40 \pm 1,23$ g), z nichž byly odebrány vzorky (přibližně 100 mg), které byly vloženy do označených zkumavek a ihned zmrazeny v tekutém dusíku. Kromě vzorků jaterní tkáně jsme stejným způsobem odebrali několik vzorků sleziny z kontrolních potkanů, které jsme použili pro zavedení a optimalizaci všech metodických postupů pro studium exprese UCP2. Výběr této tkáně byl na základě důkladné literární rešerše, neboť ve slezině byla popsána vysoká exprese mRNA UCP2 (Larrouy et al., 1997; Négre-Salvayre et al., 1997; Alán et al., 2009). Všechny vzorky byly následně uchovávány do doby zpracování při -70 °C v hlubokomrazícím boxu MDF U2086S (SANYO, Japonsko).

Všechny použité chemické látky, pokud není uvedeno jinak, byly nejvyšší dostupné čistoty a byly získány od firmy Sigma (Sigma Aldrich Co., Německo).

4.1.2. Stanovení enzymové aktivity mGPDH

4.1.2.1. Izolace jaterních mitochondrií

Izolace jaterních mitochondrií byla prováděna metodou frakční centrifugace podle Schneidera a Hogebooma (1950). Při izolaci byl použit izolační roztok o pH 7,4, jehož složení je následující - 0,25 mol/l sacharóza, 20 mmol/l Tris-HCl a 1 mmol/l etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA). Zachování funkce jaterních mitochondrií během izolace závisí především na teplotě prostředí, ve kterém se mitochondrie zpracovávají. Proto se všechny operace provádějí při teplotě 0 - 4 °C.

Vlastní izolace mitochondrií se provádí následujícím způsobem. Z resekované jaterní tkáně se odváží 3 gramy. Jaterní tkáň se přenese do kádinky s chlazeným izolačním roztokem, kde se rozstříhá na malé kousky. Izolační roztok se slije a fragmenty tkáně se v něm ještě jednou propláchnou. Tkáň se poté homogenizuje ve skleněném homogenizátoru s teflonovým pístem za neustálého chlazení. Homogenát se doplní izolačním roztokem do 30 ml (výsledná koncentrace 10 g/ml). Z homogenátu se

odebere 10 ml pro analýzu enzymů a proteinů a zbylá část se použije pro izolaci mitochondrií.

Homogenát (20 ml) se centrifuguje nejprve 5 minut při 3000 otáčkách za minutu. Tím se mitochondrie dostanou do supernatantu, který se následně přelije přes jedenkrát přeloženou gázu do nové centrifugační zkumavky a doplní se izolačním roztokem opět na 20 ml. Sediment obsahující zbytky buněčných membrán a ostatních organel se dále nepoužívá.

Supernatant se poté centrifuguje 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu, čímž se mitochondrie dostanou do sedimentu. Supernatant se slije, sediment se suspenduje v izolačním roztoku. Tento postup se ještě dvakrát zopakuje (získají se 2× promyté mitochondrie), aby se odstranily zbytky rozpustných cytoplazmatických bílkovin.

Výsledný sediment mitochondrií se suspenduje v izolačním roztoku tak, aby výsledný objem byl 2 ml. Tento vzorek mitochondrií se přenese do předem připravených a označených mikrozkušavek Eppendorf, které se uloží do mrazničky. Tam se vzorky s izolovanými mitochondriemi uchovávají při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Z každého vzorku jater (3 g) se získá 10 ml homogenátu a 2 ml mitochondriální suspenze.

4.1.2.2. Stanovení koncentrace bílkovin

Koncentrace bílkovin byla stanovena metodou podle Lowryho a spol. (1951), kde jako standard byl použit bovinní sérum albumin (BSA, 0,1% roztok). Podstatou detekce je barevná reakce tyrozinových zbytků proteinu s Folinovým reagens v alkalickém prostředí. Měření bylo prováděno na spektrofotometru UV – 1601 (Shimadzu, Japonsko).

Postup stanovení je následující. Nejprve se připraví 1% roztok vinanu sodného, 0,5% roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 2% roztok Na_2CO_3 v 0,1 mol/l NaOH, které smíchají v poměru 0,2:0,2:9,6 (nutné dodržet pořadí roztoků). Folinovo reagens se zředí destilovanou vodou v poměru 1:1.

Vzorek (10 μl) se zředí 300 \times , z tohoto objemu se odebere 200 μl , ke kterým se přidá 1 ml směsi roztoků, promíchá se a nechá se stát 15 minut při pokojové teplotě. Poté se přidá 0,1 ml zředěného Folinova reagens a ihned se vše promíchá. Po 30 minutách stání při pokojové teplotě se vzorek spektrofotometricky změří při vlnové délce 700 nm v kyvetě proti slepému vzorku.

4.1.2.3. *Spektrofotometrické stanovení enzymové aktivity mGPDH*

GPDH po přeměně glycerofosfátu na dihydroxyacetonfosfát předává redukční ekvivalenty na dichlorfenolindofenol (DCPIP), který slouží jako umělý akceptor elektronů. DCPIP je schopen odebírat dva elektrony, má spíše hydrofobní charakter a proniká membránou mitochondrií. Jeho redukce je spojena se ztrátou charakteristického modrého zbarvení. Měření absorbance bylo prováděno na spektrofotometru UV – 1601 Shimadzu při vlnové délce 610 nm.

Vlastní stanovení aktivity mGPDH se provádí následujícím způsobem. Do kyvety se připraví 940 μ l pufru o složení KCl (výchozí koncentrace 50 mmol/l), TRIS (výchozí koncentrace 10 mmol/l) a EDTA (výchozí koncentrace 1 mmol/l). Přidá se 10 μ l BSA (výchozí koncentrace 100 mg/ml), který váže mastné kyseliny blokující mGPDH, a 10 μ l KCN (výchozí koncentrace 100 mmol/l), jenž blokuje cytochrom *c*-oxidázu. Kyveta se vloží do spektrofotometru a nastaví se nulová hodnota absorbance. Do kyvety se napipetuje 10 μ l DCPIP (výchozí koncentrace 10 mmol/l) a 10 μ l mitochondriální suspenze nebo homogenátu (výchozí koncentrace závisí na množství proteinu ve vzorku). Poté se měří změna absorbance v průběhu dvou minut. Během první minuty se zjišťuje endogenní aktivita enzymu. Po první minutě se ještě přidá glycerofosfát (výchozí koncentrace 1 mol/l), který startuje celou reakci a vyjadřuje celkovou aktivitu enzymu. Celkový objem reakční směsi je 1 ml.

Pro výpočet specifické aktivity je proto nutné odečíst endogenní aktivitu od celkové aktivity enzymu a vše přepočítat na koncentraci proteinu daného vzorku. Výsledná aktivita je vyjádřena v nmol/min/mg proteinu s použitím molárního absorpčního koeficientu (ϵ_λ) DCPIP $19,1 \cdot 10^6$ cm²/mol, tj. aktivita mGPDH [nmol/l] = $[A/\text{min.} : (\epsilon_\lambda \cdot d)]$, kde $A/\text{min.}$ je absorbance v čase a d je tloušťka kyvety (1 cm). Aktivita mGPDH [nmol/min./mg mitochondriálního proteinu] = aktivita mGPDH [nmol/l]: (koncentrace mitochondriálního proteinu:ředění vzorku do kyvety).

4.1.3. **Stanovení množství mGPDH pomocí western blotu**

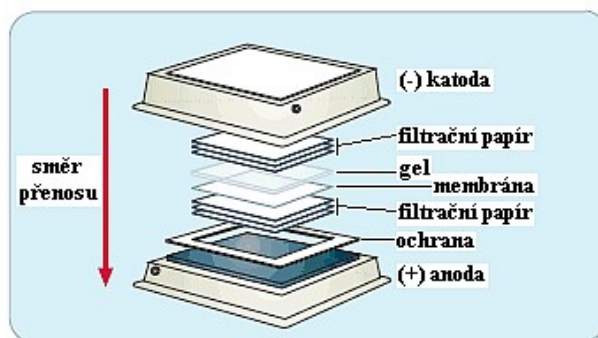
Western blot je imunochemická metoda pro detekci specifické bílkoviny ve směsi dalších bílkovin (např. v biologickém vzorku, homogenátu tkáně apod.). Principem metody je separace bílkovin (antigenů) podle jejich struktury (resp. molekulové

hmotnosti) gelovou elektroforézou s následným přenosem (blotem) na nitrocelulóзовou membránu prostřednictvím přímého styku gelu s membránou. Proteiny se váží na membránu nespecificky a zbylá vazebná místa membrány jsou blokována vhodnými proteiny (např. laktoglobuliny z odtučněného mléka, BSA). Na detekovaný protein se poté naváže buď značená protilátka a detekce se provádí přímo, nebo neznačená primární protilátka. Detekce vzniklého imunokomplexu se proto provádí v prvním případě přímo, v druhém přidavkem sekundární značené protilátky. Ty jsou obvykle značeny enzymy jako alkalická fosfatáza nebo křenová peroxidáza. Konečná detekce využívá reakce reporterového enzymu s chromogenním substrátem za vzniku barevného produktu nebo chemiluminiscenčním substrátem za vzniku nestabilního produktu. Ten se stabilizuje vyzářením kvanta světla, které je měřeno (Křemen et al., 1998).

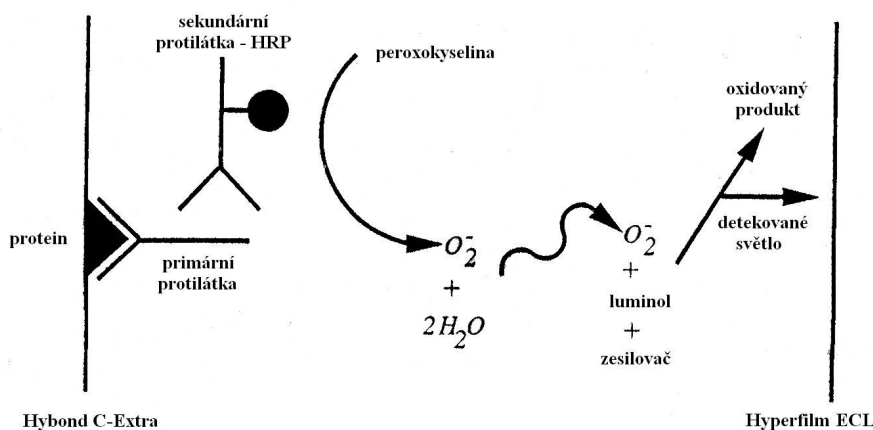
Stanovení množství mGPDH pomocí western blotu bylo prováděno pracovníky oddělení Bioenergetiky Fyziologického ústavu Akademie věd. Pro analýzu se použily vzorky proteinových alikvotů mitochondrií (10 μg /jamku) solubilizovaných v dodecylsulfátu sodném (SDS). V první části se nejprve provede diskontinuální gelová elektroforéza v SDS-10% polyakrylamidovém gelu s využitím tricinu jako táhnoucího iontu (Schagger a von Jagow, 1987), který umožňuje rozlišení malých proteinů při nižších koncentracích akrylamidu. Separace v elektrickém poli se provádí v Mini Protean II elektroforetických celách (Bio-Rad, USA). Doporučené podmínky pro optimální rozlišení jsou konstantní napětí 200 V, obvyklá doba elektroforézy 45 minut.

Proteiny z gelu se následně blotují (obr. č. 21) na nitrocelulóзовé membrány (HybondTM C-Extra, Amersham Biosciences, Velká Británie) přiložením gelu k membráně a pomocí blotovacího zařízení, který umožňuje polosuchý elektropřenos při 0,7 mA/cm² po dobu 1 hodiny. Pro detekci mGPDH je nutné zablokovat povrch membrány, která váže proteiny, tj. antigen, ale i přidané protilátky. Blokace nespecifických míst (resp. volných míst) se provádí umístěním membrány přes noc do roztoku 3% odtučněného mléka s 0,3% Tritonem X-100 v 0,15 mol/l NaCl a 0,02 mol/l Na₂HPO₄. Poté je membrána inkubována 3 hodiny s králičí polyklonální anti-mGPDH protilátkou (ředění 1:5000) zvětšenou o C-terminální peptid LDR RVP IPV DRS CGG myšího enzymu podle publikace Ueda et al. (1998). Membrány byly dále inkubovány 1,5 hodiny za použití buď koží anti-myší IgG (1:1000, A8924 Sigma, USA), nebo koží anti-králičí IgG (1:1000, F0382 Sigma, USA) jako sekundární protilátky, která byla konjugována s křenovou peroxidázou. Detekce vzniklého imunokomplexu chemiluminiscenční reakcí probíhala za použití ECL kitu (Amersham Biosciences,

Velká Británie; obr. č. 22) na přístroji LAS 1000 (Fujifilm, Japonsko) a signál se kvantifikoval pomocí Aida 3.21 Image Analyser software (Raytest, Německo).



Obr. č. 21: Schéma polosuchého elektropřenosu při blotování. Převzato z <http://www.komabiotech.co.kr/www/techniques/proteinSandT/transferSystem.gif>.



Obr. č. 22: Schéma detekce vzniklého imunokomplexu pomocí ECL kitu. Převzato z <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/WoodC/western.html>

4.1.4. Izolace RNA

Pro northern blot analýzu RNA mGPDH a polymerázovou řetězovou reakci (PCR) specifickou pro UCP2 je nejprve nutné provést izolaci RNA. Tu je možné provádět různými metodami, které je možné rozdělit na fenolové extrakční metody a metody bezfenolové, které využívají většinou iontoměničové kolonky nebo magnetické partikule. Pro naše pokusy jsme se rozhodli používat první způsob, u kterého bývá vyšší výtěžnost RNA. Pro izolaci jsme využili komerční reagentii *RNA Blue* (Top-Bio, Česká

republika) pro rychlou přípravu čisté a nedegradované RNA. Problémem jakékoliv izolace RNA je přítomnost enzymů RNáz. Tato chemikálie proto obsahuje silné inhibitory RNáz, které zajistí intaktnost vyizolované RNA, přesto je nutné při práci používat rukavice, sterilní zkumavky a podobně.

Základ této izolační metody popsali ve své publikaci Chromczynski a Sacchi (1987). Tkáň, resp. buňky jsou nejprve lyzovány a zhomogenizovány v chemikálii RNA Blue, která obsahuje fenol a další komponenty potřebné k lýze vzorku tkáně, tj. k rozvolnění nukleoproteinového komplexu. Ke vzniklému lyzátu se přidává chloroform a provede se extrakce. Pomocí krátké centrifugace se vzorek rozdělí do třech fází. První vodná fáze obsahuje RNA, druhá tzv. interfáze obsahuje DNA a spodní, modře zbarvená organická fáze obsahuje odpadní složky jako proteiny, resp. peptidy, lipidy a další. Pro další krok izolace se použije horní vodná fáze, ke které se přidá izopropylalkohol pro precipitaci RNA. Po centrifugaci a odsátí supernatantu se peleta promyje etanolem pro odstranění přítomných solí. Po další centrifugaci se opatrně odsaje veškerý etanol, vzniklá peleta RNA se vysuší a rozpustí se ve vodě o molekulárně-biologické čistotě (např. aqua pro injectione).

Postup izolace byl následující. Do úzkých plastových zkumavek se vloží přibližně 100 mg jaterní tkáň, přidá se 1 ml RNA Blue (Top-Bio, Česká republika) a provede se homogenizace tkáň pomocí homogenizátoru ULTRA-TURRAX T8 (IKA Labortechnik, Německo). Vzniklý homogenát se přelije do 1,5 ml zkumavek a inkubuje se 5 až 10 minut při pokojové teplotě. Přidá se 200 μ l chloroformu (molekulárně biologická čistota, tj. > 99,8 %; Amresco, Česká republika), vše se důkladně promíchá po dobu 20 sekund na laboratorní třepače REAX control (Heidolph, Německo) (provedení extrakce). Provede se inkubace minimálně 5 minut při pokojové teplotě, a poté centrifugace 15 minut při 15000 g a teplotě 4 °C (centrifuga MIKRO 200R, Hettich, Německo). Opatrně se odsaje horní vodná fáze do nové 1,5 ml zkumavky umístěné v ledu, přidá se 500 μ l izopropylalkoholu (molekulárně biologická čistota, tj. > 99,0 %; Sigma, Česká republika) a vše se promíchá. Opět se provede inkubace 10 minut při 4 °C (na ledu) a centrifugace 15 minut při 15000 g a teplotě 4 °C. Opatrně se odsaje supernatant, k peletě se přidá 1 ml 75% etanolu (připraven z 96% etanolu; P-LAB, Česká republika), vše se důkladně promíchá a centrifuguje při 8000 g, 4 °C po dobu 5 minut. Opatrně se odsaje veškerý supernatant (pozor neodstranit peletu), peleta se vysuší při 37 °C v Dri Block BBA2 (GRANT BOEKEL, Velká Británie) od zbytků

etanolu (pozor nepřesušit). Vyizolovaná RNA se poté rozpustí v 50 μ l vody (Aqua pro injectione, Braun, Německo) a nechá se rozpouštět tak, aby RNA byla v celém objemu homogenní. Možné urychlit zahřátím na 55 až 60 $^{\circ}$ C. RNA se uchovává při -70 $^{\circ}$ C do dalšího zpracování nebo pro případnou archivaci po dobu i více než 6 měsíců.

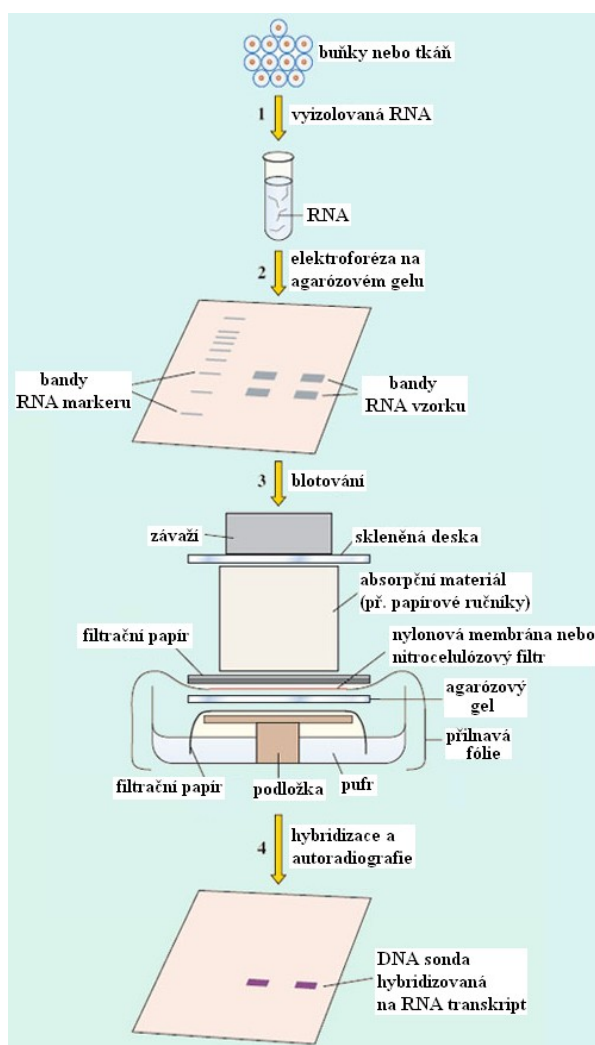
Před uchováním je vhodné provést spektrofotometrické měření čistoty a koncentrace vyizolované RNA. Vzorek RNA naředit 200 \times destilovanou vodou (Aqua pro injectione, Braun, Německo) a na spektrofotometru (UV 1601, Shimadzu, Japonsko) změřit absorbanci při 260 nm (A_{260} , absorpční maximum nukleových kyselin) a 280 nm (A_{280} , absorpční maximum proteinů). Z naměřených údajů je možné vypočítat čistotu vyizolované RNA jako poměr A_{260}/A_{280} a koncentraci RNA podle následujícího vzorce: koncentrace RNA [μ g/ml] = $40 \cdot A_{260} \cdot \text{\textit{ředící faktor}}$, tedy 200). Čistota vyizolované RNA se v našich pokusech pohybovala v rozmezí 1,9 až 2,1.

4.1.5. Stanovení RNA mGPDH pomocí northern blotu

Northern blot je technika používaná v molekulární biologii ke studiu genové exprese, resp. transkripce určitých genů detekcí RNA (event. mRNA) ve vzorku. Lze tak zjistit informace o identitě RNA, její velikosti a množství. Během procesu se nejprve elektroforeticky separuje RNA podle velikosti, ta se poté přenáší (blotuje) z gelu na membránu (nylonovou membránu nebo nitrocelulósový filtr). K detekci specifické RNA na membráně se využívá hybridizace značených sond komplementárních k části cílové sekvence nebo k celé sekvenci. SONDY jsou obvykle syntetické jednořetězcové DNA oligonukleotidy značené buď použitím radioizotopů (32 P, 35 S) nebo vazbou k enzymům, které mohou vytvářet barevný produkt. Jestliže je na membráně přítomna RNA našeho zájmu, značená sonda se hybridizuje a vytváří tak na membráně duplex. Značka na navázané sondě je pak vizualizována autoradiograficky nebo přidáním vhodného enzymového substrátu za vzniku barevného produktu, který je detekován.

Northern blot analýzu RNA mGPDH prováděli pracovníci oddělení Bioenergetiky Fyziologického ústavu Akademie věd, kde se toto stanovení dlouhodobě provádí. Postup analýzy (obr. č. 23) začíná elektroforetickou separací RNA v 1,25% agarózovém gelu obsahujícím 20 mmol/l MOPS (4-morfolinpropansulfonová kyselina, pH 7,0), 6,7% formaldehyd, 50 mmol/l acetát sodný a 10 mmol/l EDTA. Poté byla rozdělena

RNA přenášená přes noc na nylonovou Hybond-N-membránu (Amersham Biosciences, Velká Británie) pomocí kapilárního blotování. Membrána se pro potlačení nespecifických vazeb prehybridizuje při 42 °C po dobu 2 hodin v 10 ml prehybridizačního roztoku (5× SSC o pH 7,0, 5× Denhardtovo činidlo, 0,5% SDS, 50 mmol/l fosfát sodný o pH 6,5, 50% formamid a 100 µg/ml DNA ze sledího sperma). Následně se membrána hybridizuje ve stejném roztoku s přidavkem [³²P]dATP-značené cDNA, značené pomocí náhodného primingu pomocí DECAprime II kitu (Ambion, USA). Bloty se hybridizují na DNA sondu korespondující s 396 bp fragmentem potkaní mGPDH (báze 306 až 701 otevřeného čtecího rámce, ORF). Pro normalizaci se používá sonda korespondující s myší 18S rRNA (Hwang et al., 1996). Radioaktivní signál je exponován pomocí Phosphor Storage Screen a kvantifikován pomocí BAS-5000 systémem (Fuji, Japonsko).



Obr. č. 23: Schéma northern blotu. Převzato z http://open.jorum.ac.uk/xmlui/bitstream/handle/123456789/956/Items/S377_1_section7.html.

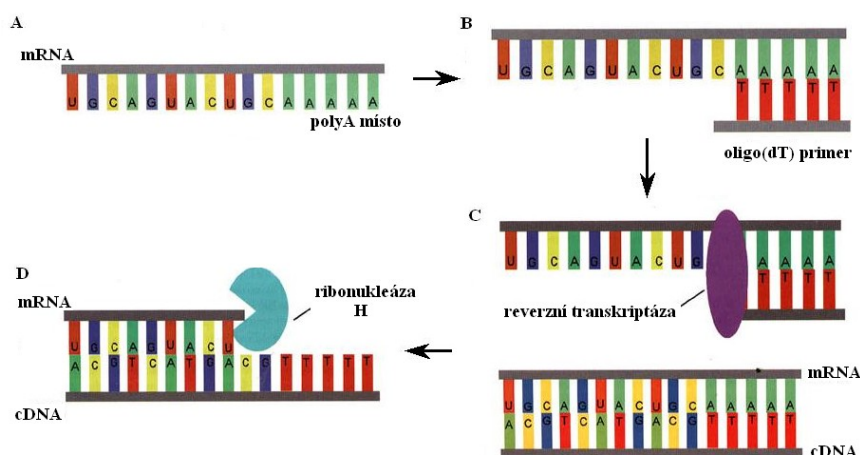
4.1.6. Stanovení RNA UCP2

4.1.6.1. Reverzní transkripce

Polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) není možné analyzovat přímo RNA, proto je nutné nejprve provést reverzní transkripci (RT). Jedná se o proces, kdy dochází k přepisu RNA do podoby tzv. copy DNA (komplementární DNA, cDNA), kterou je možné dále analyzovat. Tato cDNA je komplementární kopií RNA s jediným rozdílem, že neobsahuje introny. Přepis katalyzuje enzym RNA-dependentní DNA polymeráza, nebo-li reverzní transkriptáza. Tento enzym se evolučně vyvinul u RNA virů (retrovirů), kteří potřebují zabudovat RNA do DNA hostitelské buňky.

Principem reverzní transkripce je syntéza cDNA, kterou provádí reverzní transkriptáza, označovaná také jako 5'→3' DNA polymeráza, jež katalyzuje polymeraci polydeoxyribonukleotidu z deoxyribonukleosidtrifosfátu na RNA-matrici. Zdrojem enzymu je ptačí myeloblastický virus (AMV) nebo Moloney myší leukemický virus (M-MLV), který má slabší RNázovou aktivitu. To znamená, že při syntéze dlouhých řetězců cDNA nedochází k degradaci matricové RNA. Pro zahájení syntézy cDNA, resp. fungování enzymu je však nutná přítomnost oligonukleotidového primeru, například oligo(dT) nebo oligo(dT)VN o délce 12 až 18 nukleotidů. Ten se na základě komplementarity váže na polyadenylační místo (polyA) na 3'-konci mRNA. Syntéza cDNA tedy začíná od 3' konce primeru a zařazování nukleotidů v cDNA je řízeno sekvencí mRNA, výsledkem je vznik hybridní molekuly mRNA-cDNA.

Při reverzní transkripci se v dnešní době využívají další enzymy, ribonukleáza H, DNA-polymeráza a DNA-ligáza, které jsou potřebné pro vytvoření druhého vlákna cDNA. Po vytvoření prvního vlákna cDNA vznikají působením ribonukleázy H zlomy a mezery v řetězci mRNA hybridu mRNA-cDNA, čímž vznikají primery, na nichž začíná DNA-polymeráza syntézu druhého vlákna cDNA. Na závěr poté poslední enzym DNA-ligáza kovalentně spojí nasyntetizované řetězce do souvislého vlákna, které svojí délkou odpovídá délce mRNA. Takto vytvořená cDNA již může vstupovat jako templát do polymerázové řetězové reakce (Křemen et al., 1998).



Obr. č. 24: Reverzní transkripce. *A* – RNA templát s polyadenylačním místem (polyA); *B* – přisednutí oligo(dT) primeru k polyA místu mRNA; *C* – syntéza tzv. prvního vlákna cDNA od 3' konce primeru pomocí reverzní transkriptázy, která zařazuje komplementárně baze nukleotidů, na konci tohoto kroku vzniká hybridní molekula mRNA-cDNA; *D* – odstranění RNA pomocí ribonukleázy H za vzniku cDNA.

Optimalizace a postup reverzní transkripce

Pro přepis RNA jsme zvolili dva postupy, mezi kterými jsme v rámci optimalizace reverzní transkripce vybírali. První postup využíval reverzní transkriptázu myšího leukemického viru (M-MLV) od firmy Top-Bio spolu s oligo(dT)₁₅VN primerem o sekvenci 5'-TTT TTT TTT TTT TTT VN3' a druhý komplexní systém SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR od firmy Invitrogen. Optimalizaci reverzní transkripce jsme prováděli na kontrolních vzorcích jaterní tkáně a sleziny.

První postup s využitím M-MLV reverzní transkriptázy

Příprava reakční směsi probíhala v laminárním boxu Mini V/PCR (TELSTAR, Španělsko) podle tabulky č. 3, kde je uvedeno složení pro jeden vzorek. Pro více vzorků je poté nutné tento uvedený objem vynásobit počtem vzorků. Všechny chemikálie se smíchají v 1,5 ml zkumavce, důkladně se promíchají, zcentrifugují (Mikrocentrifuga 100 VAC, ROTH, Taiwan) a rozpipetují se po 27 µl do předem připravených PCR mikrozkuvek. Následně se přidají do každé zkumavky 3 µl vzorku, resp. RNA, to znamená, že celkový objem reakční směsi pro RT byl 30 µl. Takto připravené mikrozkuvky se následně vloží do termocykléru FT GRAD 2D (Techne, Velká Británie) a spustí se požadovaný, předem naprogramovaný, teplotní profil, který byl:

37 °C 60 minut, 94 °C 5 minut a 4 °C po dobu 2 minut. Připravená cDNA se v případě potřeby uchovávala při -20 °C do dalšího zpracování.

Tab. č. 3: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci pro jeden vzorek.

<i>Chemikálie a výchozí koncentrace</i>	<i>Objem (v μl)</i>
voda	12,0 μ l
5 \times koncentrovaný pufr	6,0 μ l
deoxyribonukleosidtrifosfáty (2,5 mmol/l)	1,5 μ l
dithiotreitol (DTT, 100 mmol/l)	3,0 μ l
oligo (dT) ₁₅ VN primer (50 μ mol/l)	1,5 μ l
M-MLV reverzní transkriptáza (200 U/ μ l)	3,0 μ l
27 μ l připravené směsi + 3,0 μ l RNA (o koncentraci 1000 μ g/ml)	

Pozn.: použité chemikálie a jejich výrobci -

5 \times koncentrovaný pufr pro reverzní transkripci (RT pufr, který obsahuje 250 mmol/l Tris-HCl o pH 8,3, 375 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl₂), Top-Bio, Česká republika

M-MLV reverzní transkriptáza (200 U/ μ l), Top-Bio, Česká republika

směs nukleotidů = deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTPs; 2,5 mmol/l dATP, dTTP, dCTP, dGTP), TaKaRa, Japonsko

dithiotreitol (DTT, 100 mmol/l), Top-Bio, Česká republika

primer oligo(dT)₁₅VN, Generi-Biotech, Česká republika

voda - Aqua pro injectione, B-Braun, Německo

Druhý postup s využitím SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR

SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) je komplexní systém, který obsahuje všechny potřebné komponenty pro provedení reverzní transkripce.

Příprava reakční směsi začíná smícháním 4,0 μ l „random hexamerů“ se 2,0 μ l dNTPs a 2,0 μ l diethylpyrokarbonátem (DEPC) ošetřené vody v 1,5 ml zkumavce. Následně se směs rozpipetuje do PCR mikrozkušavek po 8 μ l, ke kterým se přidá 10 μ l RNA vzorku. Vše se inkubuje 5 minut při 65 °C (Dri Block BBA2, GRANT BOEKEL, Velká Británie) a následně se vše umístí na 1 minutu na led. Během inkubace se připraví směs o složení 8,0 μ l 5 \times koncentrovaného RT pufru s MgCl₂, 4,0 μ l

dithiotreitolu, 2,0 µl RNase OUT ribonuclease Inhibitoru a 4,0 µl vody. Tato směs se po inkubaci přidá do zkumavky, zlehka se vše promíchá a krátce zcentrifuguje (Mikrocentrifuga 100 VAC, ROTH, Taiwan). Provede se 2-minutová inkubace při 25 °C, přidá se reverzní transkriptáza (2 µl). Opět se provede inkubace 10 minut při 25 °C, 50 minut při 42 °C a 15 minut při 70 °C (termocyklér FT GRAD 2D, Techne, Velká Británie). Poté se vše ihned zchladí na ledu, přidá se RNase H (2 µl) a nakonec se vše inkubuje při 37 °C po dobu 20 minut. Připravená cDNA se v případě potřeby uchovává při -20 °C do dalšího zpracování.

Po zvolení vhodného postupu reverzní transkripce jsme optimalizovali rovněž vstupní koncentraci RNA, neboť jsme v našich pokusech potřebovali porovnávat výsledky exprese UCP2 v jednotlivých vzorcích. Bylo tedy nutné, aby vstupní koncentrace mRNA byla vždy stejná. Z tohoto důvodu testovali tyto koncentrace RNA – 250, 500, 750, 1000 a 1500 µg/ml.

4.1.6.2. *Kontrola účinnosti reverzní transkripce pomocí polymerázové řetězové reakce*

Pro testování úspěšného průběhu, tj. účinnosti reverzní transkripce jsme zavedli standardní polymerázovou řetězovou reakci s primery pro tzv. housekeepingový gen glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (GAPDH) s následnou elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu. cDNA všech testovaných vzorků byla touto metodou vždy ověřena.

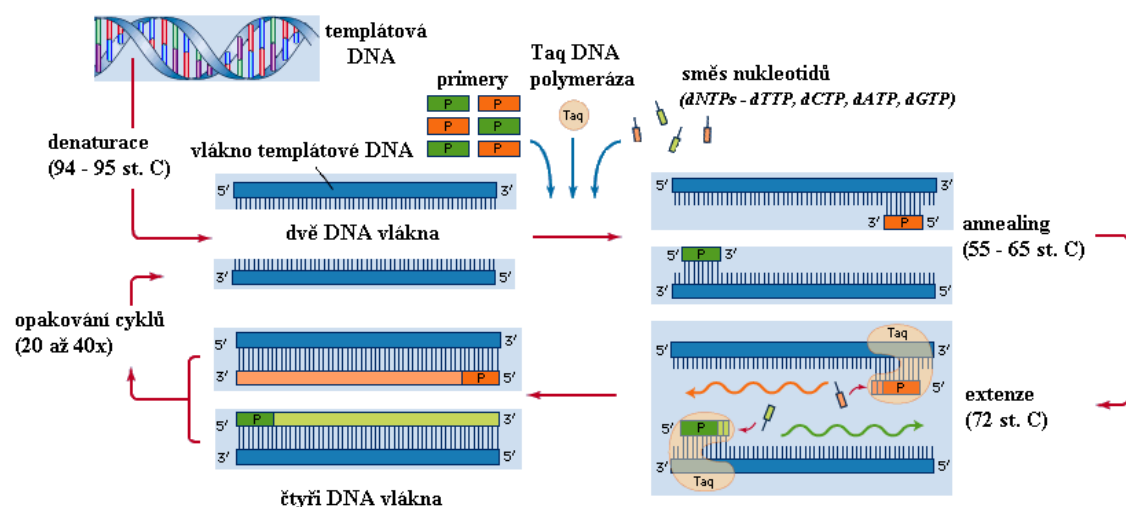
Polymerázová řetězová reakce (PCR) je *in vitro* metoda pro enzymatickou syntézu, nebo-li amplifikaci definované sekvence DNA v cyklické reakci. Ta využívá dvou oligonukleotidových primerů, které hybridizují s protichůdnými vlákny denaturované DNA a od 3'-konců primerů je zahájena amplifikace komplementárních řetězců. Syntézu nové DNA katalyzuje termostabilní DNA polymeráza, v reakčním prostředí jsou přítomny deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTPs), které představují stavební kameny pro nově syntetizovanou DNA.

Reakce vždy začíná úvodní denaturací při 94 až 95 °C po dobu 2 – 10 minut, kdy dochází k oddělení komplementárních řetězců dvouvláknové DNA. Tento krok je velmi důležitý, neboť nekompletní denaturace templátu může vést k rychlé renaturaci templátové DNA, což může způsobit nescifickou vazbu primerů a vznik

nespecifických produktů (falešných výsledků). Následuje vlastní polymerázová řetězová reakce, která se skládá z opakovaných reakčních cyklů. Jednotlivé cykly tvoří tři teplotní kroky. První je denaturace pro oddělení dvoušroubovicových řetězců DNA při 94 až 95 °C po dobu 25 – 60 s, někdy i více. Následuje tzv. annealing, kdy dochází k hybridizaci specifických primerů na obě komplementární vlákna DNA. Teplota se pohybuje v rozmezí 50 – 65 °C a je nutné ji experimentálně optimalizovat, časový interval tohoto kroku se pohybuje mezi 30 až 120 sekund. Poslední je extenze při 72 °C, po dobu 45 až 90 sekund, kdy dochází k syntéze nových komplementárních řetězců DNA pomocí DNA polymerázy a všech čtyř deoxyribonukleosidtrifosfátů. Vzniklé řetězce poté slouží jako templáty pro další cyklus. Obvykle se využívá 20 až 35 cyklů, přičemž v každém cyklu se množství molekul oproti předcházejícímu zdvojnásobí. Během pozdějších cyklů začnou v roztoku převažovat naamplifikované molekuly o určité velikosti ohraničené z obou stran primery, které tak zpomalují a zastavují samotnou reakci. Tomu napomáhá i vyčerpání samotného enzymu a stavebních kamenů (dNTPs). Konečným krokem celého procesu je závěrečná extenze (72 °C po dobu 5 až 15 minut), která slouží k dokončení syntézy všech nedokončených řetězců a renaturaci jednořetězcových produktů (Křemen et al., 1998).

Reakční směs o objemu mezi 20 až 100 μl (u nás obvykle 25 μl) vždy obsahuje templátovou nukleovou kyselinu (DNA nebo cDNA), specifické primery, deoxyribonukleosidtrifosfáty, hořečnaté ionty, termostabilní Taq DNA polymerázu a reakční pufr, který udržuje pH obvykle v rozmezí 8,3 – 9,0. Primery jsou syntetické oligonukleotidy o velikosti 10 až 30 nukleotidů, jejichž sekvence a koncentrace významně ovlivňuje výsledek PCR. Deoxynukleotidy se používají ve formě Na^+ nebo Li^+ solí a jejich koncentrace je nejčastěji 0,2 mmol/l. Hořečnaté ionty vytváří s dNTPs rozpustný komplex, který rozpoznává DNA polymeráza. Navíc je potřeba, aby v reakci byli také volné Mg^{2+} ionty, které jsou kofaktory Taq DNA polymerázy. Pro dosažení nejlepšího výsledku se proto koncentrace Mg^{2+} stanovuje experimentálně, neboť optimální koncentrace může kolísat od 1 mmol/l do 5 mmol/l. Další složkou je termostabilní Taq DNA polymeráza, která se izoluje z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech. Enzym se vyznačuje 5'-3' exonukleázovou aktivitou a jeho teplotní optimum je okolo 75 °C, ale vydrží i teploty nad 90 °C. Použití termostabilních polymeráz umožnilo zautomatizování celého procesu v přístrojích, tzv.

termocyklérech, které automaticky mění teplotu většinou pomocí Peltierových článků v kovovém bloku podle předem zadaného programu (Křemen et al., 1998).



Obr. č. 25: Princip polymerázové řetězové reakce.

Vzniklé produkty se analyzují pomocí elektroforézy, během které nukleové kyseliny (DNA) migrují v gelu (např. agarózovém) vlivem působení stejnosměrného elektrického pole a rychlost této migrace je nepřímo úměrná dekadickému logaritmu počtu párů bazí (bp). Při neutrálním pH je DNA negativně nabitá (v důsledku ionizace fosfátových skupin), a proto migruje od katody směrem k anodě. Příčinou rovnoměrného rozložení negativních nábojů v molekulách DNA a RNA je sacharido-fosfátová páteř nukleových kyselin.

Elektroforéza se provádí v horizontální poloze submerzní formou. K jejímu provedení se používají elektroforetické vany a hřebeny různých rozměrů. Agarózové gely bývají 3-6 mm silné a jejich rozlišovací schopnost závisí zejména na koncentraci agarózy, která se volí podle velikosti separovaných molekul. Do gelu se pomocí hřebene se vytváří jamky pro nanášení produktu PCR, který je před nanesením do jamky smíchan s nanášecím roztokem (tzv. loading buffer, někdy označován také jako vkládací pufr). Ten je těžký a viskózní, což umožňuje napipetování vzorku do jamky v gelu pod pufr. Nanášecí roztok obsahuje také barvy (př. bromfenolovou modř), které řídí délku dělení, a proto lze sledovat, v jaké části gelu se fragmenty nacházejí. Elektroforéza probíhá při pokojové teplotě, nejčastěji používané napětí je okolo 100 V.

Pro vizualizaci DNA fragmentů se z fluorescenčních látek používá nejčastěji ethidium bromid, který vytváří komplex s DNA (tzv. interkalační barvivo). Tento komplex absorbuje UV světlo o vlnové délce 260 - 300 nm.

Postup polymerázové řetězové reakce a elektroforézy

Sekvence používaných primerů pro housekeepingový gen GAPDH byla: forward primer 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' a reverse primer 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' (Saito et al., 2000). GAPDH je glykolytický enzym, který katalyzuje syntézu 1,3-bisfosfoglycerátu. V tabulce č. 4 je uvedeno složení reakční směsi pro jeden vzorek, jejíž příprava probíhá v laminárním boxu V/PCR (TELSTAR, Španělsko). Všechny chemikálie se smíchají v 1,5 ml zkumavce, důkladně se promíchají (Laboratorní třepačka REAX control, Heidolph, Německo), krátce zcentrifugují (Mikrocentrifuga 100 VAC, ROTH, Taiwan) a rozpipetují se po 20 µl do PCR mikrozkušavek. Následně se přidá do každé zkumavky 5 µl cDNA vzorku, to znamená, že celkový objem reakční směsi pro kontrolní PCR byl 25 µl. Takto připravené mikrozkušavky se následně vloží do termocykléru FT GRAD 2D (Techne, Velká Británie) a spustí se požadovaný, předem naprogramovaný, teplotní profil, který byl: úvodní denaturace 5 minut při 94 °C, PCR o 28 cyklech s denaturací 1 minutu při 94 °C, annealingem při 57 °C po dobu 1 minuty a extenzí 1,5 minuty při 72 °C. Závěrečná extenze probíhala 7 minut při 72 °C.

Tab. č. 4: Složení reakční směsi pro jeden vzorek při kontrolní PCR.

<i>Chemikálie a výchozí koncentrace</i>	<i>Objem</i>
voda	10,4 µl
10× koncentrovaný PCR pufr TaKaRa	2,5 µl
dNTPs (2,5 mmol/l)	2,0 µl
MgCl ₂ (25 mmol/l)	2,5 µl
forward primer (10 pmol/µl)	1,25 µl
reverse primer (10 pmol/µl)	1,25 µl
Taq DNA polymeráza TaKaRa (5 U/µl)	0,1 µl
20 µl připravené směsi + 5,0 µl cDNA	

Pozn.: použité chemikálie a jejich výrobci -

rekombinantní Taq DNA polymeráza (5 U/µl), TaKaRa, Japonsko

směs nukleotidů (dNTPs; 2,5 mmol/l dATP, dTTP, dCTP, dGTP), TaKaRa, Japonsko
10× koncentrovaný PCR pufr (100 mmol/l Tris-HCl o pH 8,3, 500 mmol/l KCl), TaKaRa, Japonsko
MgCl₂ (25 mmol/l), TaKaRa, Japonsko
primery GAPDH forward, GAPDH reverse (10 pmol/μl), Generi-Biotech, Česká republika
voda - Aqua pro injectione, B-Braun, Německo

Vzniklé produkty jsme dále analyzovali pomocí elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu, kterou jsme prováděli následujícím způsobem. Nejprve se připraví zásobní 10× koncentrovaný pufr TBE tak, že se naváží 53,9 g Trizma base (Tris(hydroxymethyl)-aminometan, molekulárně biologická čistota, tj. 99,9 %, Sigma, Česká republika), 27,6 g kyseliny borité (molekulárně biologická čistota, tj. 99,0 %, Sigma, Česká republika) a 3,72 g EDTA (molekulárně biologická čistota, tj. > 99,0 %, Sigma, Česká republika). Vše se smíchá a rozpustí v 950 ml destilované vody, poté se pomocí 1 mol/l HCl upraví pH na 8,0 a nakonec se doplní objem na 1000 ml. 1,2 g agarózového prášku (Agaróza, Invitrogen, USA) se smíchá s 80 ml 1× koncentrovaného TBE pufru, který se připravuje čerstvým naředěním z 10× koncentrovaného pufru. Směs rozvaří v mikrovlnné troubě (Mikrovlnná trouba LCE 2031M, Le cygne electronics, Francie), a poté se ochladí přibližně na 50 °C. Přidá se 2 až 3 μl PCR ethidium bromidu (10 mg/ml, Top-Bio, Česká republika), opatrně se vše promíchá a nalije do formy elektroforetické vany. Do drážek se zasune hřeben a vše se nechá důkladně ztuhnout. Po ztuhnutí se nalije na gel potřebné množství 1× koncentrovaného TBE pufru a opatrně se vyjme hřeben z gelu. Dále se připraví vzorek pro elektroforézu – smíchá se vzorek (produkt PCR) nebo velikostní marker (DNA Molecular Weight Marker XIII s rozlišením 50 bp (250 μg/ml, Roche, Německo) nebo DNA marker 200 - 1500 s rozlišením 100 bp (100 μg/ml, Top-Bio, Česká republika) s PCR vkladacím pufrem (Top-Bio, Česká republika) v poměru 5:1 (tzn. 15 μl produktu a 3 μl pufru). Poté se nanesou opatrně vzorky do jamek a ihned se elektroforetická vana (OWL, USA) připojí ke zdroji stejnosměrného napětí E132 (Consort, Belgie). Podmínky elektroforézy – 100 až 140 V po dobu přibližně 50 až 60 minut. Po dokončení elektroforézy se provede fotodokumentace

pomocí UV transiluminátoru UVT 20 S/W (Herolab, Německo) a fotodokumentačního systému Serial N (Vilbert Lourmat, Francie).

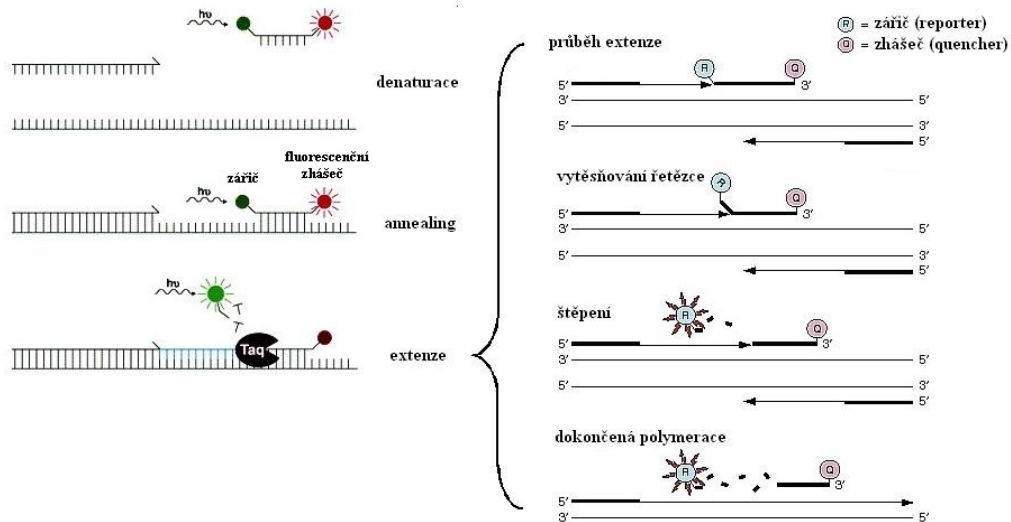
4.1.6.3. Real-time PCR

Pro zjištění exprese UCP2 mRNA jsme zvolili metodu PCR v reálném čase (real-time PCR), která oproti standardní PCR umožňuje i přesnou kvantifikaci mRNA, resp. cDNA, čímž nám umožní lépe a přesněji vystihnout změny v expresi UCP2 v jaterní tkáni po ovlivnění trijodtyroninem a po parciální hepatektomii. Tato kvantitativní PCR se provádí prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu ve speciálním přístroji, který umožňuje cyklické střídání teplot, detekci fluorescence a monitorování průběhu PCR v reálném čase bez potřeby detekovat produkty elektroforeticky. Vznik fluorescenčního signálu umožňují sondy, které se přidávají do reakčních směsí. Sondy můžeme rozdělit na nespecifické (např. SYBR Green), které se interkalují nespecificky do krátkých dvoušroubovicových produktů, nebo specifické (např. hybridizační a hydrolytické sondy), které jsou značeny fluorofory a specificky se váží na templátové vlákno jako primery.

Námi používaná real-time PCR využívá pro detekci narůstajícího množství amplikonů specifické sondy, a to hydrolytické sondy, které jsou v současnosti jedny z nejpoužívanějších. Tato PCR kromě primerů a všech ostatních složek reakční směsi používá také jednu oligonukleotidovou sondu (tzv. TaqMan sondu), která je značená na obou koncích. První fluorofor na 5'konci sondy plní funkci zářiče (reporter, R) a druhý na 3'konci má funkci zhášече (quencher, Q). Tato hydrolytická sonda se specificky váže na templátové vlákno DNA během annealingu stejně jako primery.

Během denaturace (94 až 95 °C) dochází k oddělení vláken dvoušroubovice DNA. Po poklesu teploty na annealingovou teplotu (většinou na 60 °C) hybridizují primery a sonda komplementárně k templátovému vláknu. Během těchto dvou fází je sonda ve výchozím stavu, kdy zhášеч potlačuje záření emitované blízkým zářičem, a to procesem fluorescenčně rezonančního přenosu energie (FRET). Při tomto procesu se zářič excituje na vyšší energetickou hladinu energií světelného zdroje přístroje, při zpětném přechodu emituje fluorescenční záření o vyšší vlnové délce. Záření však není pozorováno, protože jeho energie je ihned pohlcena zhášечem, který je tím excitován.

Zhášeč při zpětném přechodu do základního energetického stavu uvolňuje nadbytečnou energii ve formě fluorescence o vyšší vlnové délce (fluorescenční zhášeč) nebo ve formě tepla (nefluorescenční zhášeč).



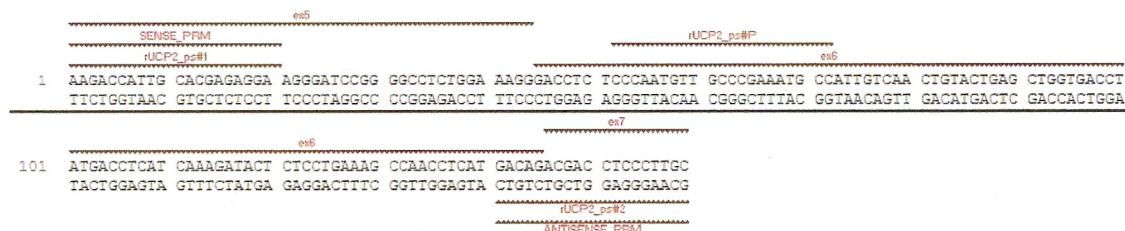
Obr. č. 26: Princip real-time polymerázové řetězové reakce při využití hydrolytické sondy.

Teprve při vytváření nového řetězce během extenze Taq polymeráza svojí 5'→3' exonukleázovou aktivitou nejdříve rozruší komplex sondy s cílovou sekvencí DNA. Poté dojde k exonukleázovému rozštěpení TaqMan sondy a oddálení zhášeče. Zřič, který se tak vymanil z tlumivého vlivu zhášeče, emituje fluorescenci dané vlnové délky. Měření vznikající a narůstající fluorescence přímo v reakční zkumavce probíhá až na konci elongace (extenze). Intenzita fluorescence je úměrná množství vzniklého PCR produktu.

4.1.6.3.1. Real-time PCR pro UCP2

Real-time PCR specifickou pro potkaní UCP2 (RefSeq NM_019354) jsme museli nejprve zavést. Primery a hydrolytickou sondu jsme si nechali navrhnout a nasyntetizovat firmou Generi-Biotech (Česká republika) tak, aby nebyla amplifikována genomická DNA. To znamená, že zvolené primery pro PCR mají exon-exonové uspořádání. Forward primer (UCP2 forward) 5' AAG ACC ATT GCA CGA GAG GA3' se nachází na 5. exonu, reverse primer (UCP2 reverse) 5' GCA AGG GAG GTC GTC TGT C3' začíná na 6. exonu a končí na 7. exonu. Hydrolytická sonda o sekvenci 5' CCC

AAT GTT GCC CGA AAT GCC3' se nachází na 6. exonu a je značená na 5'konci fluorescenčním barvivem FAM (6-karboxyfluorescein) a na 3'konci zhášecem BHQ (z angl. Black Hole Quencher). BHQ je nefluorescenční zhášec, který potlačuje záření FAM absorpcí energie, kterou následně uvolňuje ve formě tepla. Délka vzniklého produktu (amplikonu) je 159 bp.



Obr. č. 27: Uspořádání primerů a hydrolytické sondy. SENSE_PRM (rUCP2_ps#1) – forward primer, ANTISENSE_PRM (rUCP2_ps#2) – reverse primer, rUCP2_ps#P – hydrolytická sonda, ex – exon.

Jako základ reakční směsi pro real-time PCR jsme vybrali komerčně dodávaný TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2× koncentrovaný, Applied Biosystems, USA). Jde o „ready-to-use“ systém, který obsahuje reakční pufr, dNTPs, hořčičné ionty, uracil-N-glykosylázu (UNG) pro zabránění kontaminace PCR reakce produktem a v neposlední řadě tzv. HotStart DNA polymerázu. Jedná se o enzym, jenž má v aktivním místě navázanou protilátku, která je zničena během denaturace a polymeráza může tak plnit svoji funkci. Všechny složky komerčního mixu jsou již optimalizovány výrobcem, proto je nutné experimentálně zjistit pouze koncentrace primerů a sondy, resp. jejich poměr.

Real-time PCR jsme prováděli na přístroji ABI-PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA), ve kterém jsou změny teplot jednotlivých teplotních kroků PCR dosahovány díky peltierovým článkům. Amplifikační reakce probíhá ve speciálních 96-jamkových optických mikrodestičkách překrytých optickou adhezivní fólií, které se umísťují do unikátního nosítka. Ten přesune destičky do 96-jamkového bloku z hliníku, jenž umožňuje optimální přenos tepla mezi blokem a mikrodestičkou. Přístroj má vyhřívané víko pro optimální přenos tepla a rovnoměrný ohřev během teplotního cyklování, které tlačí vahou 31,8 kg na mikrodestičku a jeho teplota 105 °C (± 3 °C) je během PCR konstantní. Excitace fluoroforů je zajištěna argon-laserovým zdrojem (488 nm, resp. 488 až 514 nm) a emitovaná fluorescence je zaměřována pomocí systému čoček, filtrů a dichroického

zrcadla na mřížku, která rozděluje signál do obrazce na CCD kameře (detekce vlnových délek mezi 500 až 660 nm). Výsledná emitovaná fluorescence je měřena a čtení údajů z celé destičky trvá 7 až 10 vteřin. SDS program snímá signály ze CCD kamery a dále je zpracovává pomocí matematických algoritmů.

Odečet PCR reakce se provádí pomocí threshold cyklu (Ct) a thresholdu. Ten vyjadřuje obvykle 10× standardní odchylky signálu pro časné PCR cykly, nebo-li baseline (většinou 3. – 15. cyklus), a je stanoven pro každý běh. To umožňuje zjištění hodnot threshold cyklu (Ct), který vyjadřuje cyklus, ve kterém fluorescence vytvořená během reakce protne threshold (tj. první detekce signifikantního vzrůstu fluorescence). Takto zjištěný threshold cyklus je nepřímě úměrný logaritmu množství vstupního templátu (počtu kopií DNA).

Optimalizace real-time PCR

Všechny kroky optimalizace byly provedeny na vzorcích RNA izolovaných ze sleziny kontrolních potkanů, protože literární údaje popisují přítomnost RNA UCP2 právě ve slezině. Důvodem tohoto postupu byla skutečnost, že jsme neměli k dispozici kontrolní vzorek UCP2 RNA, popř. cDNA, pomocí kterého by bylo možno provádět optimalizaci. V rámci experimentů jsme zjišťovali optimální koncentrace primerů a sondy, resp. jejich poměrů, složení reakčních směsí při optimalizaci jsou uvedena v tabulce č. 5, příprava probíhala stejným způsobem jako při PCR pro GAPDH. Před vložením destičky do real-time přístroje ABI-PRISM 7900HT Sequence Detection System je nutné provést krátkou centrifugaci (Centrifuga Multifuge 3S s rotorem pro mikrotitrační destičky, Heraeus, Německo), aby došlo k odstranění případných bublin v jednotlivých jamkách.

Real-time PCR pro jednotlivé poměry koncentrací jsme provedli vždy v dubletu a jednotlivé reakce jsme vyhodnotili pomocí Ct hodnot, které jsme odečítali při thresholdu 0,05 a při pozadí (baselině) nastavené mezi 3. až 15. cyklem.

Při použití hydrolytických sond je možné použít univerzální teplotní profil pro real-time PCR reakce, který byl následující: 2 minuty při 50 °C, kdy uracil-N-glykosyláza (UNG) likviduje případnou kontaminaci produktem předchozích PCR reakcí, úvodní denaturace při 95 °C po dobu 10 minut a 55 cyklů, při kterých se opakuje denaturace 15 sekund při 95 °C a annealing spojený s extenzí při 60 °C po dobu 1 minuty, kdy dochází k odečtu fluorescence zářiče.

Tab. č. 5: Složení reakční směsi pro jeden vzorek při optimalizaci real-time PCR pro UCP2.

Chemikálie a výchozí koncentrace	Objem (v μl) při uvedených poměrech koncentrace primerů a sondy v $\mu\text{mol/l}$									
	0,4:0,1	0,4:0,2	0,4:0,3	0,4:0,4	0,2:0,2	0,3:0,2	0,4:0,2	0,5:0,2	0,6:0,2	
voda	4,2	4,0	3,8	3,6	4,8	4,4	4,0	3,6	3,2	
TaqMan Universal Master Mix (2 \times konc.)	10,0									
primer UCP2 forward (10 pmol/ μl)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	
primer UCP2 reverse (10 pmol/ μl)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	
sonda (10 pmol/ μl)	0,2	0,4	0,6	0,8	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	
cDNA	4,0									
Celkový objem reakční směsi	20,0 μl									

Pozn.: použité chemikálie a jejich výrobci -

*TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2 \times koncentrováný), Applied Biosystems, USA
 primery UCP2 forward, UCP2 reverse (10 pmol/ μl), Generi-Biotech, Česká republika
 sonda UCP2 (10 pmol/ μl), Generi-Biotech, Česká republika
 voda - Aqua pro injectione, B-Braun, Německo*

Pro možnost kvantifikace RNA UCP2, resp. cDNA, bylo nutné vytvořit externí kalibrační křivku pomocí plazmidových standardů. Z tohoto důvodu nám firma Generi-Biotech provedla zaklonování PCR produktu do plazmidu pCR[®]4Blunt-TOPO[®]. Přítomnost inzertu ověřili pomocí PCR, restrikcí, ale také sekvenací, kdy zjistili, že sekvence klonovaná do plazmidu zcela odpovídala referenční sekvenci NM_019354. Ze získaného plazmidu o čistotě 1,9, velikosti 4113 bp a koncentraci $2,03 \cdot 10^{12}$ kopií/ml jsme vytvořili ředící řadu a kalibrační křivku jsme vytvořili pomocí 7 standardů o koncentraci $2,03 \cdot 10^{10}$ až $2,03 \cdot 10^4$ kopií/ml.

4.1.6.3.2. Výběr housekeepingového genu a jeho real-time PCR

Pro sledování exprese UCP2 genu je nutné všechny výsledky PCR reakcí tzv. normalizovat k nějakému housekeepingovému genu, který vykazuje v pokusech minimální změny exprese, to znamená, že v experimentech musí vykazovat stabilitu. Tento vybraný gen se také označuje jako referenční gen nebo interní kontrola. Při výběru housekeepingového genu jsme měli dle aktuálních literárních zdrojů na výběr ze dvou možností. První možností bylo použití 3 různých housekeepingových genů, vůči kterým by byla data pro UCP2 normalizována. Tuto možnost jsme ihned zamítli, protože by obnášela značné finanční a časové zatížení, neboť by bylo nutné analyzovat všechny vzorky pro vybrané tři geny. Druhou možností byla analýza několika housekeepingových genů, z nichž bychom vybrali optimální gen (Vandesompele et al., 2002; Radonić et al., 2004; Dheda et al., 2004; Huggett et al., 2005). Proto jsme u firmy Generi-Biotech (Česká republika) objednali „RC-GUEST assays“, tj. optimalizované kvantitativní PCR systémy pro kvantifikaci exprese housekeepingových genů u potkanů za využití hydrolytických sond značených FAM a BHQ. Z nabídky této firmy jsme vybrali čtyři potkaní housekeepingové geny – B2M (β -2-microglobulin), HPRT1 (hypoxantine phosphoribosyl-transferase 1), SURF1 (surfeit 1) a TBP (TATA box binding protein). Reakční směs těchto analýz obsahovala 10 μ l 2 \times koncentrovaného komerčního TaqMan[®] Universal PCR Master Mixu (Applied Biosystems), 2 μ l 10 \times koncentrované směsi primerů a sondy pro jednotlivé housekeepingové geny, 4 μ l vody a cDNA jako templát. Celkový objem byl 20 μ l, kde cDNA představovala 20 % objemu, tj. 4 μ l. Teplotní profil těchto analýz byl standardní pro real-time PCR s využitím hydrolytické sondy, tedy 50 °C 2 minuty, 95 °C 10 minut, 55 cyklů s denaturací 95 °C 15 sekund a annealingem s extenzí 60 °C po dobu 1 minuty, na jejichž konci byla snímána fluorescence. Real-time PCR reakce pro všechny geny jsme prováděli se vzorky jaterní tkáně a sleziny, které byly odebrány ve stejných časových intervalech jako pro sledování exprese UCP2. To znamená kontrolní vzorky a vzorky po aplikaci T₃ nebo parciální hepatektomii, které byly odebrány po 1, 3, 6, 12 a 24 hodinách po ovlivnění. Analýzy jednotlivých genů jsme udělali vždy v dubletu. Sekvence primerů a sondy všech genů je nám však neznámá, neboť to je firemní tajemství. Referenční sekvence (RefSeq) pro B2M je NM_012512, pro HPRT1 NM_012583, pro SURF1 je NM_172068.1 a pro TBP NM_001004198.1. Odečet PCR reakce se prováděl stejným způsobem jako u real-time PCR pro UCP2.

Pro kvantitativní analýzu vybraného housekeepingového genu byla také vytvořena kalibrační křivka z plazmidu o původní koncentraci $1,0 \cdot 10^{12}$ kopií/ml, kdy jednotlivé body byly o koncentraci $1,0 \cdot 10^{10}$ kopií/ml, $1,0 \cdot 10^9$ kopií/ml, $1,0 \cdot 10^8$ kopií/ml, $1,0 \cdot 10^7$ kopií/ml, $1,0 \cdot 10^6$ kopií/ml, $1,0 \cdot 10^5$ kopií/ml a $1,0 \cdot 10^4$ kopií/ml.

4.1.6.3.3. *Vyhodnocení výsledků real-time PCR pro UCP2 a housekeepingový gen*

Real-time PCR reakci specifickou pro UCP2 a pro housekeepingový gen (HG) jsme u všech experimentálních vzorků prováděli v dubletu. Odečet výsledků Ct hodnot PCR reakcí pro UCP2 a HG byl vždy za stejných podmínek, tj. při nastavení manuálního thresholdu na 0,05 a pozadí mezi 3. a 15. cyklem. Vyhodnocení získaných výsledků jsme prováděli pomocí relativní kvantifikace využívající $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu s korekcí účinnosti amplifikace (Livak a Schmittgen, 2001; Pfaffl et al., 2009). Výpočet podle vztahu na obrázku č. 30 (Pfaffl et al., 2009) jsme prováděli manuálně pomocí programu Microsoft Excel. Výsledky exprese UCP2 jsou tedy vyjádřeny jako poměr relativní exprese UCP2 ovlivněného vzorku vůči neovlivněným kontrolním vzorkům (100% exprese, tj. 1,0). Všechny výsledky exprese RNA UCP2 byly normalizovány na expresi housekeepingového genu.

$$RE = \frac{(E_{UCP2})^{\Delta Ct_{UCP2}}}{(E_{HG})^{\Delta Ct_{HG}}}$$

$$\Delta Ct_{UCP2} = \bar{Ct}_{UCP2 \text{ kontroly}} - \bar{Ct}_{UCP2 \text{ vzorku}}$$

$$\Delta Ct_{SURF1} = \bar{Ct}_{HG \text{ kontroly}} - \bar{Ct}_{HG \text{ vzorku}}$$

Obr. č. 28: Výpočet pro zjištění exprese sledovaného genu pomocí relativní kvantifikace. RE – poměr relativní exprese, E – účinnost real-time PCR, UCP2 – uncoupling protein 2, HG – housekeepingový gen, Ct – threshold cyklus, \bar{Ct} - průměr Ct hodnot vzorku analyzovaného v dubletu. *Převzato a upraveno dle Pfaffl et al., 2009.*

4.1.7. Stanovení koncentrace celkového a volného trijodtyroninu

Stanovení koncentrace celkového a volného trijodtyroninu v séru se provádělo na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové na analyzátoru DPC

IMMULITE 2000 (DPC, USA) pomocí komerčních souprav IMMULITE 2000 Total T₃ a IMMULITE 2000 Free T₃.

Stanovení koncentrace celkového T₃ (tT₃) je založeno na kompetitivní chemiluminiscenční enzymové imunoanalýze na pevné fázi, tj. na rovnovážné konkurenční reakci následované chemiluminiscenční reakcí. Analýza se provádí v reakční zkumavce, kde je na polystyrenové kuličce navázána myší monoklonální protilátka proti trijodtyroninu. Kulička se smíchá se vzorkem séra a trijodtyroninem značeným alkalickou fosfatázou, a poté se inkubuje 30 minut, během nichž dochází ke konkurenční reakci. Nenavázaný materiál se odstraní odstředivým promýváním. Přidá se substrát (fosforečný ester adamantyl dioxetanu), který hydrolyzuje při styku s alkalickou fosfatázou za vzniku nestabilního meziproduktu. Ten se ihned rozpadá za produkce záření, které se detekuje luminometrem. Intenzita vzniklého záření je nepřímo úměrná koncentraci celkového T₃ ve vyšetřovaném vzorku. Analytická citlivost metody je 0,29 nmol/l a mez stanovitelnosti 9,2 nmol/l.

Principem stanovení volného T₃ (fT₃) v séru je kompetitivní analogově založená imunoanalýza s chemiluminiscenční detekcí. Na polystyrenové kuličce v reakční zkumavce je navázána myší monoklonální protilátka proti trijodtyroninu. Kulička se inkubuje 30 minut se vzorkem biotinem značeným analogem trijodtyroninu, kdy probíhá konkurenční reakce s omezeným počtem vazebných míst. Nenavázaný materiál se odstraní odstředivým promýváním. Kulička se opět inkubuje 30 minut s alkalickou fosfatázou konjugovanou s avidinem, a poté se nenavázaná fosfatáza odstraní odstředivým promýváním. Přidá se substrát (fosforečný ester adamantyl dioxetanu), který hydrolyzuje stykem s alkalickou fosfatázou za vzniku nestabilního meziproduktu. Ten se ihned rozpadá za produkce záření, které se detekuje luminometrem. Intenzita vzniklého záření je nepřímo úměrná koncentraci fT₃ ve vyšetřovaném vzorku. Souprava je optimalizována tak, že značený analog T₃ má neměřitelnou afinitu k TBG (globulin vázající tyroxin). Vazbě na albumin se zabraňuje tzv. blokující reagensy v takové koncentraci, aby naopak nedocházelo k uvolňování již navázaného T₃. Analytická citlivost metody je 1,5 pmol/l a mez stanovitelnosti 61 pmol/l.

4.1.8. Provedení parciální hepatektomie

Potkani byli podrobena parciální hepatektomii v mírné éterové narkóze podle metody Higginse a Andersona (1931), kdy je 65 až 70 % jaterní tkáně odstraněno. Během operace se nejprve provede horní střední laparotomie, po podvázání se vyjme střední a levý laterální lalok jater a břišní stěna se po vrstvách zašije. Zákrok se provádí vždy mezi 8. a 10. hodinou dopoledne, aby se zabránilo vlivu diurnálních změn, a poté jsou potkani chováni za standardních podmínek až do doby usmrcení, tedy 1, 3, 6, 12 a 24 hodin po provedení parciální hepatektomie. Zvířata byla usmrcena v éterové narkóze exsanquinací z bifurkace břišní aorty, poté byla potkanům chirurgicky vyjmuta játra, z nichž byly odebrány vzorky (přibližně 100 mg). Ty byly vloženy do předem označených zkumavek, ihned zmrazeny v tekutém dusíku a následně uchovávány v hlubokomrazícím boxu MDF U2086S (SANYO, Japonsko) při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby zpracování (izolace RNA).

4.1.9. Statistické vyhodnocení výsledků

Testování statistické významnosti (p) bylo provedeno pomocí jednofaktorového ANOVA testu, pro porovnání rozdílů mezi jednotlivými skupinami byl použit Tukey-Kramerův test. Pro statistické vyhodnocení byl použit statistický program Graph-Pad Prism 4.03 (GraphPad Software, USA), grafy byly vytvořeny pomocí MSExcel (Microsoft). Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou. Hodnoty p nižší než 0,05 („*“) byly stanoveny jako statisticky významné na hladině významnosti 95 %, $p < 0,01$ („**“) na hladině 99 % a hodnoty $p < 0,001$ („***) na hladině významnosti 99,9 %.

4.2. Výsledky

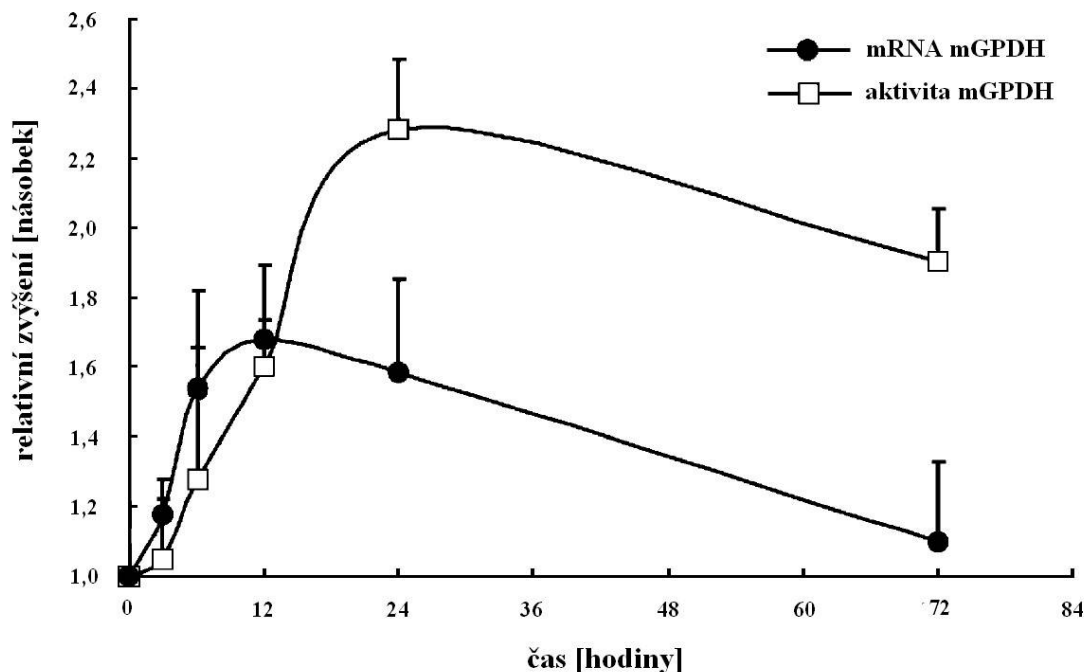
4.2.1. Výsledky stanovení mGPDH

4.2.1.1. *mGPDH po jednorázovém podání trijodtyroninu*

Ke studiu aktivace kinetiky mGPDH jsme použili jednu dávku trijodtyroninu a sledovali jsme časový průběh změny aktivity mGPDH v izolovaných mitochondriích jater a množství mRNA kódující mGPDH v játrech. Enzymová aktivita mGPDH byla sledována spektrofotometrickou metodou pomocí umělého akceptoru elektronů dichlorfenolindofenolu (DCPIP), a to v mitochondriích izolovaných z jater laboratorního potkana. Spektrofotometrickou metodou hodnotíme dehydrogenázovou aktivitu enzymů v podmínkách, kdy se dosahuje její maximální hodnoty, tedy v podmínkách, které v buňce neexistují. Množství mRNA bylo stanoveno pomocí northern blotu. Potkany jsme rozdělili do šesti skupin, první skupina byla kontrolní, dalších pět skupin bylo experimentálních, kdy potkanům byl jednorázově aplikován trijodtyronin a jejich usmrcení bylo po 3, 6, 12, 24 a 72 hodinách od aplikace. Obsah mGPDH proteinu pomocí western blotu byl analyzován pouze u potkanů usmrcených 24 hodin po podání hormonu (Mráček et al., 2005).

Jak vyplývá z grafu č. 1, již po 3 hodinách dochází k signifikantnímu zvýšení mRNA mGPDH, kdežto v případě aktivity mGPDH až po 6 hodinách. Výrazné zvýšení množství mRNA mGPDH probíhalo mezi 3 a 6 hodinou a maximální vzestup byl zjištěn u potkanů, kteří byli usmrceni 12 hodin po aplikaci T_3 . Poté docházelo k poklesu obsahu mRNA, přesto ještě 72 hodin od podání T_3 je detekováno signifikantní 20% zvýšení. V případě enzymové aktivity mGPDH v izolovaných mitochondriích bylo maximální zvýšení pozorováno až o 12 hodin později než u množství mRNA, tj. 24 hodin po hormonální aplikaci. Poté následoval pozvolný pokles, kdy mezi 24 a 72 hodinami byl zjištěn signifikantní 30% pokles. To lze pravděpodobně vysvětlit již redukovanou mRNA syntézou. Zvýšená enzymová aktivita po 24 hodinách dobře korelovala se zvýšeným obsahem proteinu měřeným ve stejném čase (skoro 2,3×

indukce enzymové aktivity vs. 2,7× indukce množství proteinu, graf č. 1 a obr. č. 30). To může vyloučit možnou kinetickou aktivaci mGPDH a naznačit tak, že *de novo* syntéza enzymu je zodpovědná za indukci biogeneze mGPDH.



Graf č. 1: Změny enzymové aktivity mGPDH v mitochondriích izolovaných z jater potkanů a množství mRNA mGPDH v játrech potkanů po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu. RNA mGPDH byla normalizována k referenčnímu genu 18S rRNA a enzymová aktivita je vyjádřena jako relativní množství vůči aktivitě kontrolního vzorku.

4.2.1.2. mGPDH opakovaném podání trijodtyroninu

U laboratorních potkanů, kterým byl opakovaně aplikován trijodtyronin, byla sledována enzymová aktivita mGPDH v homogenátech a mitochondriích izolovaných z jater. Potkani byli rozděleni do tří skupin vždy po devíti. První byla skupina kontrolních potkanů, druhá skupina potkanů usmrcených po 24 hodinách od třetí aplikace trijodtyroninu a třetí byla skupina potkanů, kteří byli usmrceni až po 72 hodinách od poslední aplikace T₃. Obsah mGPDH proteinu pomocí western blotu byl analyzován pouze u potkanů usmrcených 24 hodin od poslední aplikace třetí dávky hormonu.

Z výsledků v tabulce č. 6 vyplývá, že se aktivita mGPDH v homogenátech statisticky významně zvyšuje po aplikaci trijodtyroninu. Rozdíl aktivity mGPDH u vzorků

získaných po 24 hodinách od poslední aplikace T_3 a kontrolních vzorků je trojnásobný. Pro zjištění chování aktivity mGPDH po aplikaci T_3 byla nechána jedna skupina potkanů naživu po 72 hodin od poslední aplikace. Stanovením aktivity mGPDH u těchto vzorků se zjistilo, že dochází k jejímu pozvolnému snižování, neboť poměr ku kontrolním vzorkům byl pouze 2,8.

Tab. č. 6: Spektrofotometrické stanovení aktivity mitochondriální glycerofosfát-dehydrogenázy (mGPDH) pomocí akceptoru elektronů DCPIP v homogenátech jaterní tkáně potkana.

skupina potkanů	<i>n</i>	aktivita mGPDH [nmol/min./mg proteinu]	poměr vůči KO	statistická významnost
KO	9	1,85 ± 0,76	---	---
3 T_3 _24h	9	5,61 ± 1,02	3,0	***
3 T_3 _72h	9	5,26 ± 0,96	2,8	***

Pozn.: KO - kontrolní vzorky

3 T_3 _24h - vzorky po 24 hodinách od třetí aplikace T_3

3 T_3 _72h - vzorky po 72 hodinách od třetí aplikace T_3

n – celkový počet potkanů v jednotlivých skupinách

*** - $p < 0,001$.

Tab. č. 7: Spektrofotometrické stanovení aktivity mitochondriální glycerofosfát-dehydrogenázy (mGPDH) pomocí akceptoru elektronů DCPIP v mitochondriích jaterní tkáně potkana.

skupina potkanů	<i>n</i>	aktivita mGPDH [nmol/min./mg proteinu]	poměr vůči KO	statistická významnost
KO	9	4,99 ± 2,25	---	---
3 T_3 _24h	9	18,28 ± 8,52	3,7	***
3 T_3 _72h	9	17,53 ± 5,53	3,5	***

Pozn.: KO - kontrolní vzorky

3 T_3 _24h - vzorky po 24 hodinách od třetí aplikace T_3

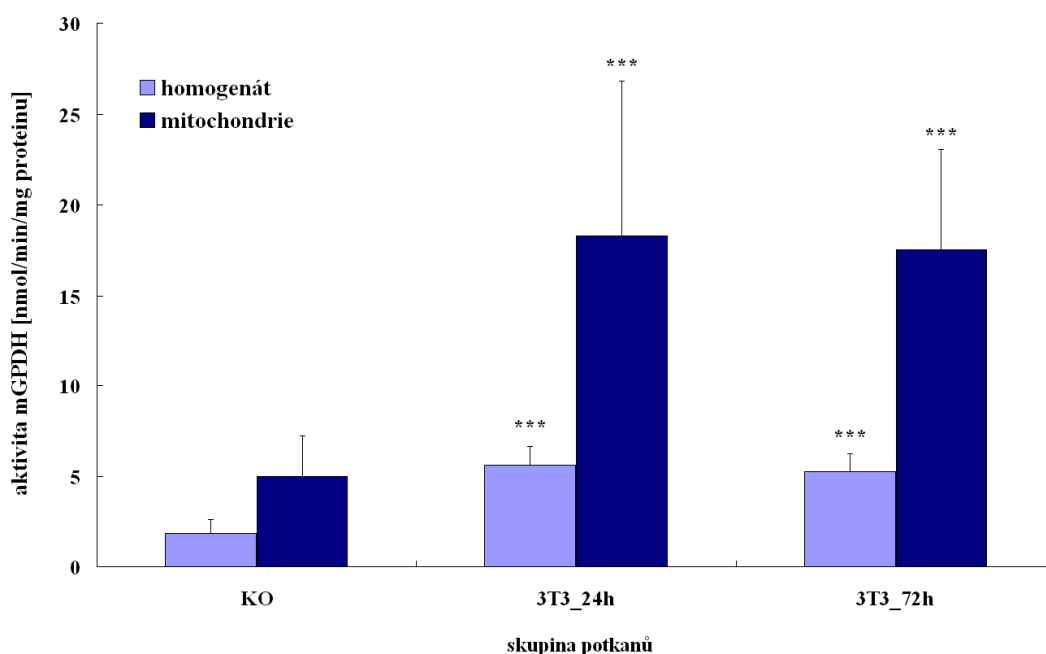
3 T_3 _72h - vzorky po 72 hodinách od třetí aplikace T_3

n – celkový počet potkanů v jednotlivých skupinách

*** - $p < 0,001$.

Tabulka č. 7 ukazuje opět statisticky významnou indukci aktivity mGPDH po podání trijodtyroninu jako je tomu u homogenátů. U mitochondrií však byla pozorována o trochu větší indukce aktivity mGPDH, kdy po 24 hodinách dochází k výraznému vzestupu aktivity enzymu po aplikaci T_3 . Poté následuje pozvolný pokles, což dokazuje výsledek aktivity mGPDH u potkanů, kteří byli usmrceni až po 72 hodinách od poslední aplikace T_3 .

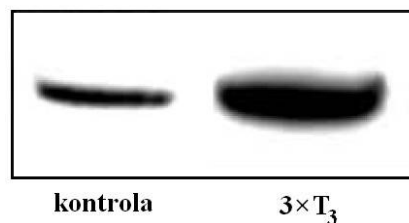
Zvýšení hodnot u vzorků mitochondrií a homogenátů (graf č. 2) po indukci trijodtyroninem není z důvodu změny aktivity enzymu, ale nýbrž změnou množství enzymu, který je vysvětlován syntézou mRNA mGPDH a syntézou enzymu *de novo*.



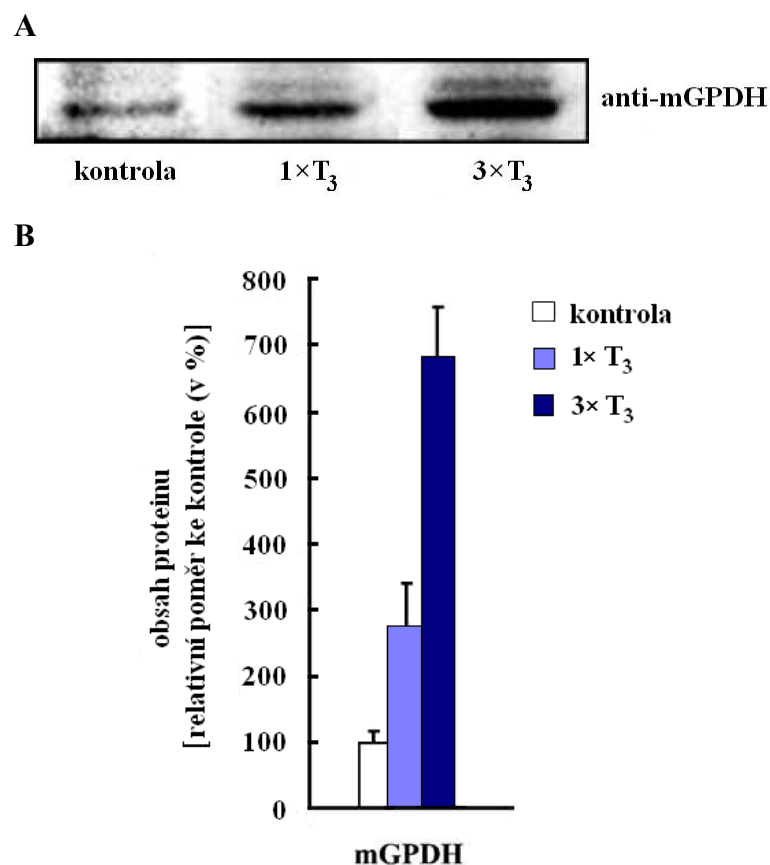
Graf č. 2: Aktivita mGPDH v homogenátech a izolovaných mitochondriích jater u jednotlivých skupin potkanů po aplikaci tří dávek trijodtyroninu.

Při detekci množství proteinu jsme pozorovali selektivní vzrůst mGPDH pomocí western blotu s využitím specifických polyklonálních protilátek proti mGPDH mezi kontrolními vzorky mitochondrií a vzorky po ovlivnění třemi dávkami T_3 (obr. č. 29). Stejnou detekci jsme provedli i u mitochondrií potkanů, kterým byla podána pouze jedna dávka hormonu. Jak ukazuje obrázek č. 30, po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu dochází v mitochondriích potkanů ke 2,7× zvýšení mGPDH. V porovnání s potkany, kteří dostali tři dávky hormonu, byl tento vzestup o více než 50 % nižší (2,7× zvýšení

u jedné dávky vs. 6,8× zvýšení u tří dávek trijodtyroninu). Zvýšení mGPDH proteinu koreluje se zvýšenou enzymovou aktivitou, kde byl rozdíl mezi aktivitou mGPDH u jedné dávky a tří dávek necelých 50 % (2,3× zvýšení u jedné dávky vs. 3,7× zvýšení u tří dávek trijodtyroninu). Tato data tak potvrzují specifickou indukci mGPDH tyroidními hormony v jaterních mitochondriích potkanů.



Obr. č. 29: Obsah mGPDH v mitochondriích izolovaných z jater kontrolních potkanů a potkanů po stimulaci třemi dávkami trijodtyroninu (usmrcení 24 hodin po poslední aplikaci) detekovaný pomocí western blotu.



Obr. č. 30: **A** Detekce množství mGPDH v mitochondriích kontrolních potkanů a potkanů po ovlivnění trijodtyroninem pomocí western blotu. **B** Kvantitativní vyjádření western blotu.

4.2.2. Výsledky stanovení mRNA UCP2

4.2.2.1. Schémata pokusů

Cílem dalších pokusů bylo sledování kinetiky exprese UCP2 po indukci trijodtyroninem (200 µg/kg tělesné hmotnosti). Zejména na základě výsledků northern blotu pro mGPDH jsme se rozhodli rozdělit potkany v jednotlivých experimentech do 6 skupin, oproti předešlým pokusům jsme zařadili časový interval 1 hodiny a interval 72 hodin jsme naopak vynechali. Každá experimentální skupina obsahovala celkem 12 potkanů. Pro přehlednost jsou schémata pokusů uvedena v tabulce č. 8 a 9.

Tab. č. 8: Schéma jednotlivých skupin potkanů při sledování kinetiky exprese mRNA UCP2 po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu (T_3).

Skupina	<i>n</i>	Charakteristika skupiny
kontrolní	12	potkani usmrcení 3 hodiny po aplikaci jedné dávky fyziologického roztoku
T_3 _1h	12	potkani usmrcení 1 hodinu po aplikaci jedné dávky T_3
T_3 _3h	12	potkani usmrcení 3 hodiny po aplikaci jedné dávky T_3
T_3 _6h	12	potkani usmrcení 6 hodin po aplikaci jedné dávky T_3
T_3 _12h	12	potkani usmrcení 12 hodin po aplikaci jedné dávky T_3
T_3 _24h	12	potkani usmrcení 24 hodin po aplikaci jedné dávky T_3

Pozn.: n – celkový počet potkanů v jednotlivých skupinách.

Tab. č. 9: Schéma jednotlivých skupin potkanů při sledování kinetiky exprese mRNA UCP2 po aplikaci tří dávek trijodtyroninu (T_3).

Skupina	<i>n</i>	Charakteristika skupiny
kontrolní	12	potkani usmrcení 3 hodiny po aplikaci tří dávek fyziologického roztoku
3 T_3 _1h	12	potkani usmrcení 1 hodinu po aplikaci tří dávek T_3
3 T_3 _3h	12	potkani usmrcení 3 hodiny po aplikaci tří dávek T_3
3 T_3 _6h	12	potkani usmrcení 6 hodin po aplikaci tří dávek T_3

3T ₃ _12h	12	potkani usmrcení 12 hodin po aplikaci tří dávek T ₃
3T ₃ _24h	12	potkani usmrcení 24 hodin po aplikaci tří dávek T ₃

Pozn.: n – celkový počet potkanů v jednotlivých skupinách.

Zároveň jsme se rozhodli zjistit, jak je to s kinetikou exprese mRNA UCP2 po parciální hepatektomii, kdy byly chirurgicky pod narkózou odstraněny 2/3 jater. Časové intervaly, ve kterých jsme analyzovali mRNA UCP2, zůstaly nezměněné (tab. č. 10). Potkani byli usmrceni stejným způsobem jako v předchozích pokusech.

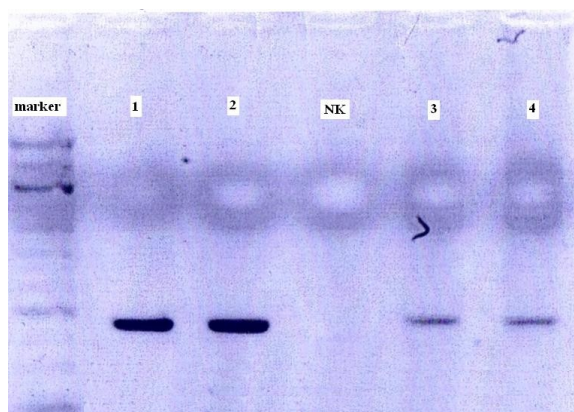
Tab. č. 10: Schéma jednotlivých skupin potkanů při sledování kinetiky exprese mRNA UCP2 po parciální hepatektomii.

Skupina	n	Charakteristika skupiny
kontrolní	5	jaterní tkáň z hepatektomovaných laloků
PH_1h	5	potkani usmrcení 1 hodinu po parciální hepatektomii
PH_3h	5	potkani usmrcení 3 hodiny po parciální hepatektomii
PH_6h	5	potkani usmrcení 6 hodin po parciální hepatektomii
PH_12h	5	potkani usmrcení 12 hodin po parciální hepatektomii
PH_24h	5	potkani usmrcení 24 hodin po parciální hepatektomii

Pozn.: n – celkový počet potkanů v jednotlivých skupinách.

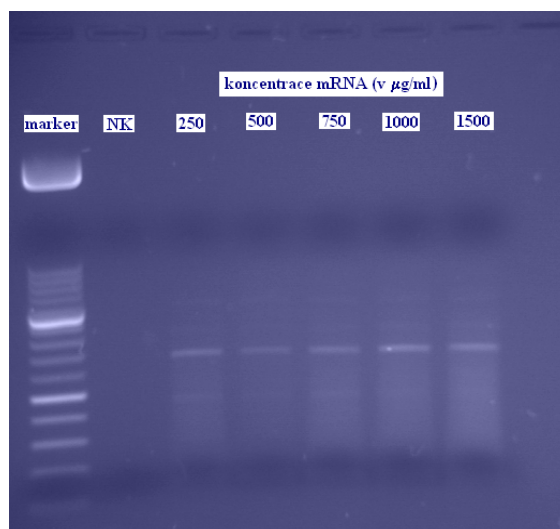
4.2.2.2. Výsledky optimalizace reverzní transkripce a její kontroly

V rámci optimalizace reverzní transkripce jsme zkoušeli dva postupy, prvním byl přepis pomocí M-MLV reverzní transkriptázy a oligo(dT)₁₅VN primeru a druhým komplexní systém „SuperScript™ First Strand Synthesis System“. Výsledek reverzní transkripce, resp. výtěžnost byla u obou postupů naprosto srovnatelná (obr. č. 31). Vzhledem k finanční a pracovní náročnosti druhého postupu jsme se rozhodli v našich dalších pokusech používat přepis RNA na cDNA pomocí enzymu M-MLV firmy Top-Bio.



Obr. č. 31: Optimalizace reverzní transkripce. Reverzní transkripce provedená u vzorku 1, 3 pomocí SuperScript™ First Strand Synthesis System (Invitrogen), u vzorku 2, 4 pomocí M-MLV reverzní transkriptázy (Top-Bio), marker – velikostní marker s rozlišením 100 bp, NK – negativní kontrola.

V našich experimentech jsme potřebovali porovnávat výsledky exprese UCP2 v jednotlivých vzorcích. Bylo tedy nutné, aby vstupní koncentrace mRNA byla vždy stejná. Z tohoto důvodu jsme optimalizovali rovněž vstupní koncentraci RNA, kdy jsme testovali tyto koncentrace – 250, 500, 750, 1000 a 1500 $\mu\text{g/ml}$. Optimální byla koncentrace 1000 $\mu\text{g/ml}$, kdy jsme pozorovali nejintenzivnější band (obr. č. 32). Při izolaci RNA měly všechny jaterní vzorky koncentraci okolo 1000 $\mu\text{g/ml}$ nebo vyšší. V těchto případech byla RNA těsně před reverzní transkripcí naředěna na potřebnou koncentraci. Konečné složení reakční směsi pro reverzní transkripci je v tabulce č. 11.

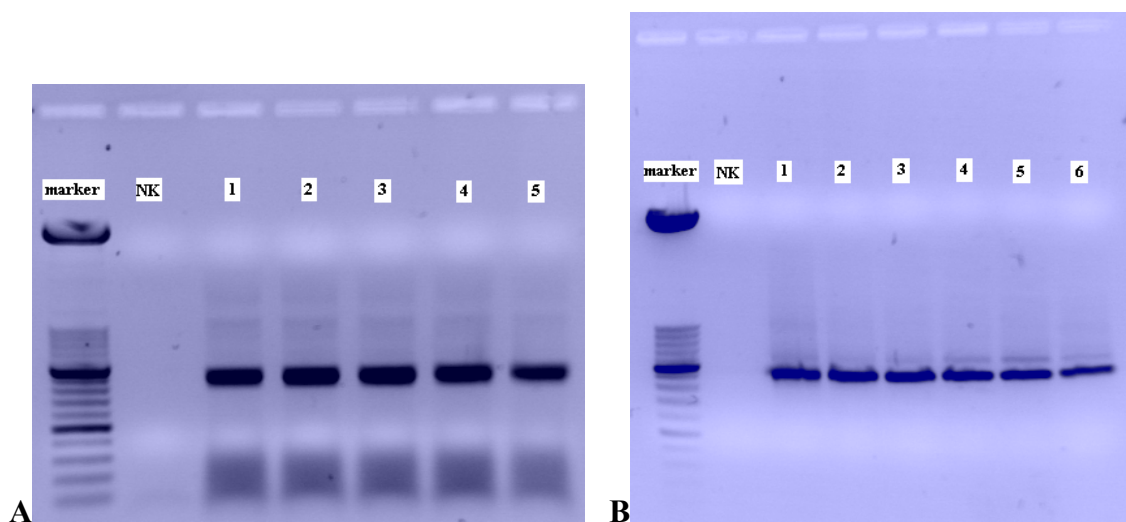


Obr. č. 32: Optimalizace vstupní koncentrace RNA pro reverzní transkripci. V první jamce zleva je velikostní marker s rozlišením 50 bp, NK – negativní kontrola, následující jamky obsahovaly vzrůstající koncentraci RNA.

Tab. č. 11: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci pro jeden vzorek.

<i>Chemikálie a výchozí koncentrace</i>	<i>Objem (v μl)</i>
voda	12,0 μ l
5 \times koncentrovaný pufr (250 mmol/l Tris-HCl, 375 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl ₂)	6,0 μ l
dNTPs (2,5 mmol/l)	1,5 μ l
oligo (dT) ₁₅ VN primer (50 μ mol/l)	1,5 μ l
M-MLV reverzní transkriptáza (200 U/ μ l)	3,0 μ l
27 μ l připravené směsi + 3,0 μ l RNA (o koncentraci 1000 μ g/ml)	

Pro kontrolu účinnosti jsme úspěšně zavedli PCR reakci pro housekeepingový gen GAPDH s primery převzatými z literatury (Saito et al., 2000). Tuto reakci jsme používali zejména pro rychlé zjištění zda reverzní transkripce proběhla či ne, proto jsme ji důkladněji neoptimalizovali a při zavádění reakce (složení PCR směsi, teplotní profil) jsme vycházeli z uvedené publikace. Na obrázku č. 33 je výsledek elektroforézy produktů PCR pro GAPDH ze vzorků jaterní tkáně a sleziny. cDNA sleziny jsme následně využili při zavedení real-time PCR specifické pro UCP2.



Obr. č. 33: Kontrola účinnosti reverzní transkripce pomocí PCR pro GAPDH. Délka požadovaného produktu je 489 bp. **A:** 1,2,3,4,5 – kontrolní vzorky sleziny, **B:** 1 - kontrolní vzorek jaterní tkáně, 2 - vzorek jaterní tkáně potkana usmrceného po 1 hod. od aplikace trijodtyroninu (T₃), 3 - vzorek jaterní tkáně potkana usmrceného po 3 hod. od aplikace T₃, 4 - vzorek jaterní tkáně potkana usmrceného po 6 hod. od aplikace T₃, 5 - vzorek jaterní tkáně potkana usmrceného po 12 hod. od aplikace T₃, 6 - vzorek jaterní

tkáně potkana usmrceného po 24 hod. od aplikace T₃, marker – velikostní marker (rozlišení 50 bp, Roche), NK – negativní kontrola.

4.2.2.3. *Výsledky optimalizace real-time PCR specifické pro UCP2*

Vzhledem k použití komerčního mixu bylo nutné optimalizovat pouze koncentraci primerů a sondy, neboť všechny ostatní složky reakční směsi jsou v používaném mixu v optimálních koncentracích. Rovněž využití hydrolytických sond nám umožnilo použít univerzální teplotní profil, který není nutné optimalizovat.

Průměrné hodnoty Ct cyklů u kontrolních vzorků sleziny pro jednotlivé koncentrace primerů a sondy použité při optimalizaci jsou uvedeny v tabulce č. 12. Všechny výsledky optimalizace byly velmi srovnatelné, přesto jsme jako nejvhodnější koncentraci obou primerů vybrali 0,4 $\mu\text{mol/l}$ a koncentraci sondy 0,2 $\mu\text{mol/l}$. Konečné složení reakční směsi, které jsme používali v našich experimentech, je v tabulce č. 13.

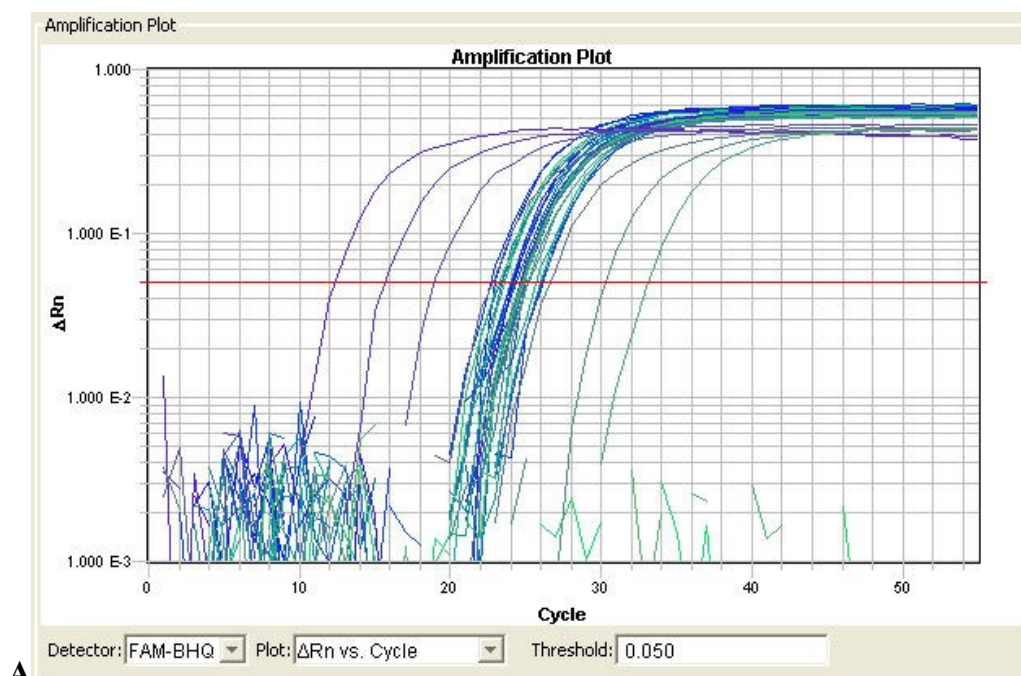
Tab. č. 12: Testované koncentrace primerů a sondy s výsledky real-time PCR specifické pro UCP2 u vzorků sleziny.

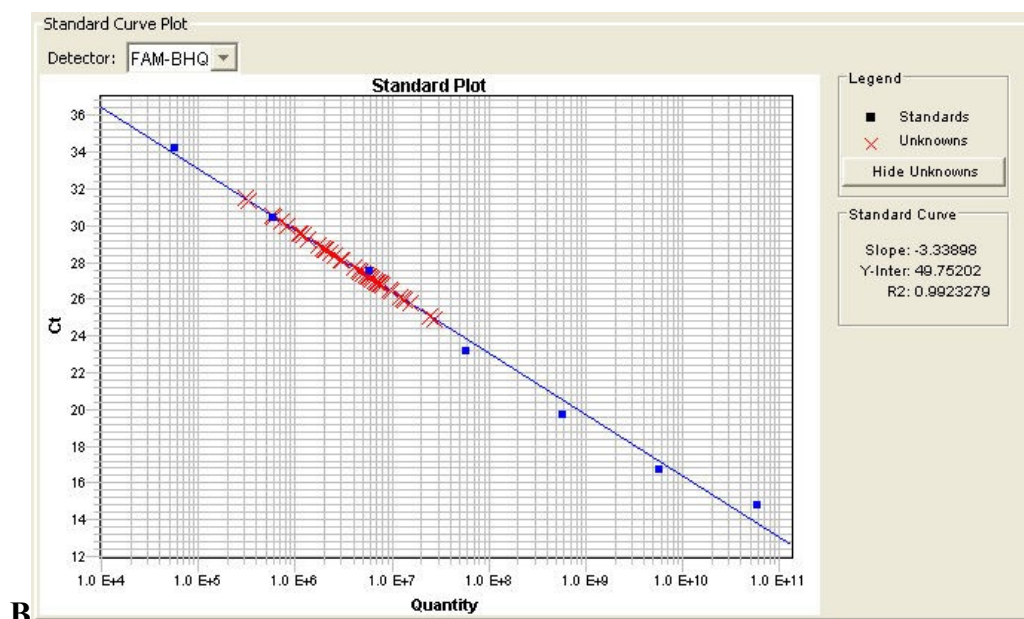
Koncentrace (<i>v $\mu\text{mol/l}$</i>)		Výsledek real-time PCR <i>(průměrné hodnoty Ct)</i>
forward, reverse primer	hydrolytická sonda	
0,4	0,1	24,42
0,4	0,2	23,59
0,4	0,3	23,83
0,4	0,4	23,89
0,2	0,2	24,63
0,3	0,2	23,84
0,4	0,2	23,46
0,5	0,2	23,73
0,6	0,2	23,61

Tab. č. 13: Konečné složení reakční směsi pro jeden vzorek při real-time PCR specifické pro UCP2.

<i>Chemikálie a výchozí koncentrace</i>	<i>Objem</i>
voda	4,0 µl
TaqMan Universal Master Mix (<i>2× konc.</i>)	10,0 µl
forward primer (<i>10 pmol/µl</i>)	0,8 µl
reverse primer (<i>10 pmol/µl</i>)	0,8 µl
sonda (<i>10 pmol/µl</i>)	0,4 µl
cDNA	4,0 µl
Celkový objem reakční směsi	20,0 µl

Ukázka amplifikačních křivek real-time PCR specifické pro UCP2 a kalibrační křivky vytvořené pomocí ředící řady plazmidů je na obrázku č. 34. Vzhledem k použití kvantifikovaných standardů jsme mohli určit pro každou PCR pro UCP2 také účinnost reakce (E) podle vztahu $E = 10^{(-1/\text{směrnice kalibrační křivky PCR reakce})}$. Ta se pohybovala vždy mezi 90 až 100 % (průměrně 93,5 % \pm 3,05 %).





Obr. č. 34: **A** – amplifikační křivky real-time PCR pro UCP2 plazmidových standardů a vzorků. **B** – Kalibrační křivka pro UCP2 vytvořena pomocí plazmidu. Modré body – kalibrační standardy o koncentraci jednotlivých bodů $2,03 \cdot 10^{10}$ kopií/ml; $2,03 \cdot 10^9$ kopií/ml; $2,03 \cdot 10^8$ kopií/ml; $2,03 \cdot 10^7$ kopií/ml; $2,03 \cdot 10^6$ kopií/ml; $2,03 \cdot 10^5$ kopií/ml; $2,03 \cdot 10^4$ kopií/ml, červené body – jednotlivé analyzované vzorky.

4.2.2.4. Výběr housekeepingového genu pro real-time PCR

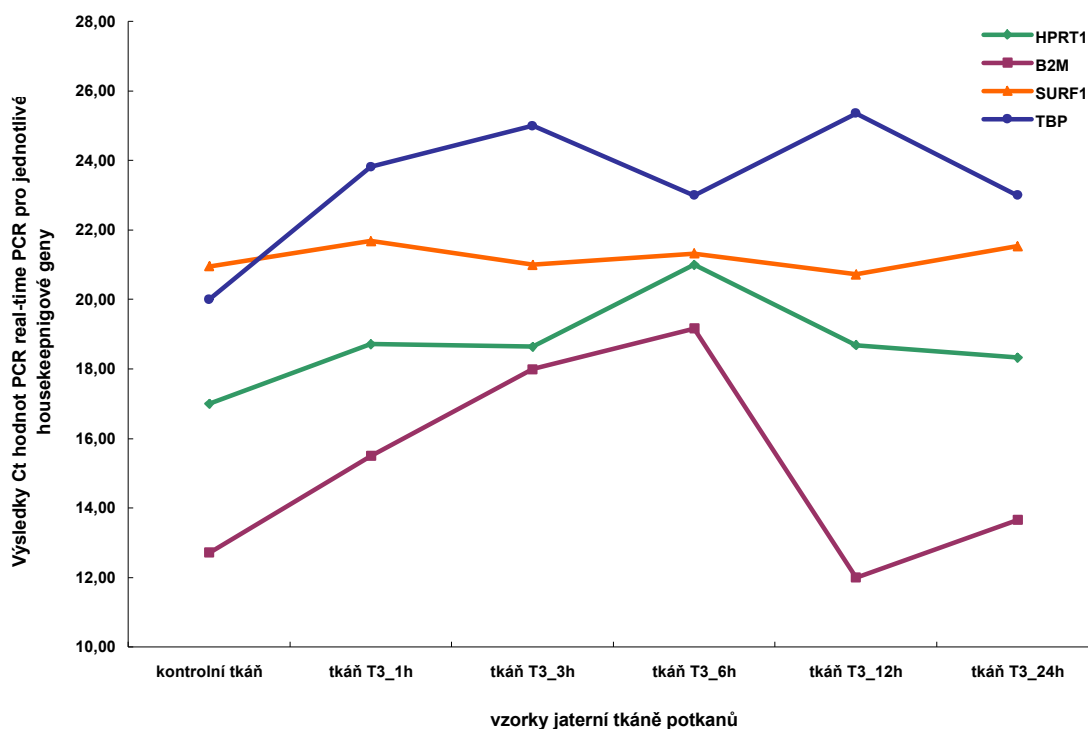
Pro real-time PCR referenčního genu pro normalizaci jsme měli na výběr ze čtyř housekeepingových genů – B2M (β -2-microglobulin), HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1), SURF1 (surfeit 1) a TBP (TATA box binding protein). Na základě PCR reakcí těchto genů u vzorků jaterní tkáň a sleziny, které byly analyzovány v různých časových intervalech v dubletu, jsme vybrali jako nejvhodnější a nejstabilnější housekeepingový gen surfeit 1 (tab. č. 14 a graf č. 3). Tento gen totiž vykazoval minimální rozdíly tzv. threshold cyklů u jednotlivých tkání.

Pro kvantitativní analýzu tohoto genu byla také vytvořena kalibrační křivka z plazmidu o původní koncentraci $1,0 \cdot 10^{12}$ kopií/ml. Kalibrační standardy o koncentraci jednotlivých bodů $1,0 \cdot 10^{10}$ kopií/ml, $1,0 \cdot 10^9$ kopií/ml, $1,0 \cdot 10^8$ kopií/ml, $1,0 \cdot 10^7$ kopií/ml, $1,0 \cdot 10^6$ kopií/ml, $1,0 \cdot 10^5$ kopií/ml a $1,0 \cdot 10^4$ kopií/ml nám umožnili vypočítat účinnost real-time PCR specifické pro surfeit 1. Ta se pohybovala u všech reakcí mezi 90 až 100 %, s průměrem 94,5 % ($\pm 2,85$ %). Na obrázku č. 35 je ukázka amplifikačních křivek a kalibrační křivky pro surfeit 1.

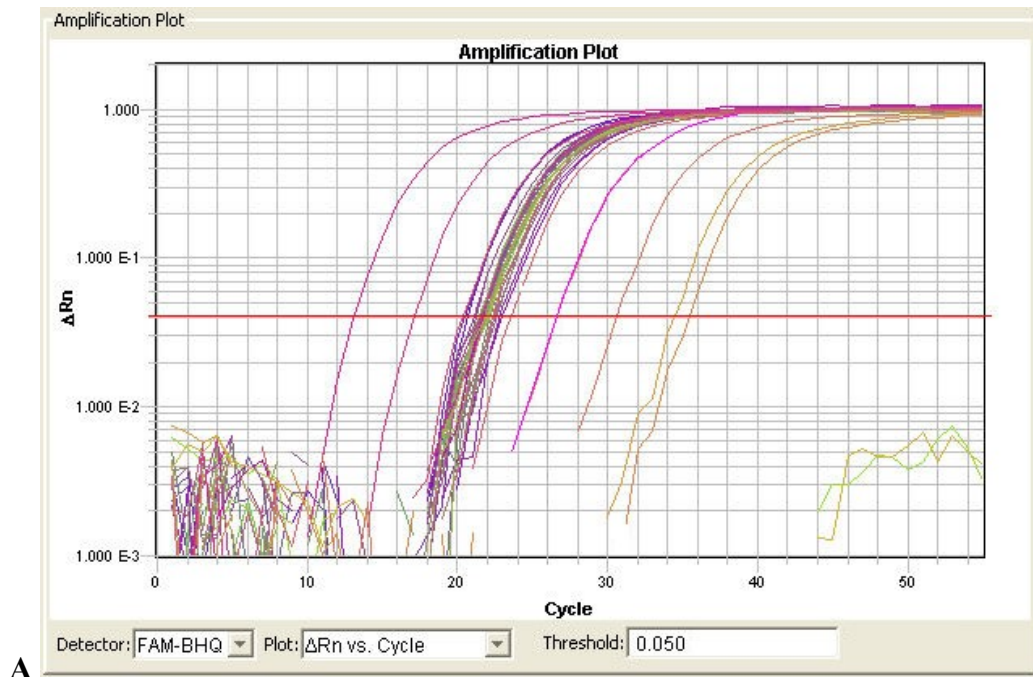
Tab. č. 14: Výsledky real-time PCR analýzy pro jednotlivé housekeepingové geny v jaterní tkáni.

Vzorek jaterní tkáně potkanů	Průměrné výsledky threshold cyklů (Ct) pro housekeepingové geny			
	<i>HPRT1</i>	<i>B2M</i>	<i>SURF1</i>	<i>TBP</i>
kontrolní tkáň	17,00	12,72	20,95	20,00
tkáň T ₃ _1h	18,71	15,50	21,68	23,82
tkáň T ₃ _3h	18,64	18,00	21,00	25,00
tkáň T ₃ _6h	21,00	19,17	21,32	23,00
tkáň T ₃ _12h	18,69	12,00	20,72	25,36
tkáň T ₃ _24h	18,33	13,66	21,53	23,00
Průměr a směrodatná odchylka	18,73 ± 1,09	15,18 ± 2,97	21,20 ± 0,39	23,36 ± 1,10

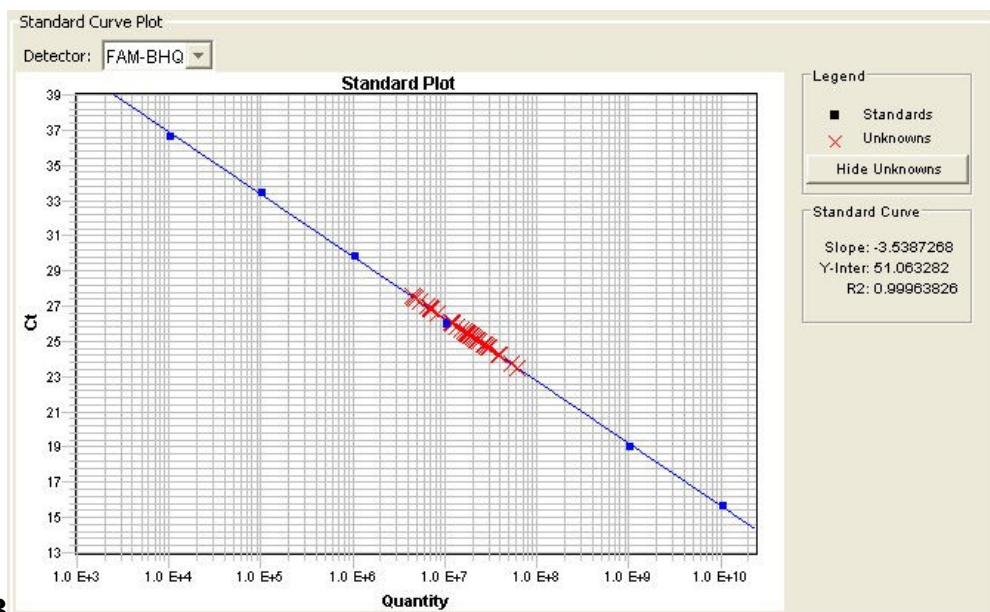
Pozn.: kontrolní tkáň - jaterní tkáň potkana, kterému byl aplikován fyziologický roztok; tkáň T₃_1h - jaterní tkáň potkana usmrceného 1 hod. po aplikaci trijodtyroninu atd.; *HPRT1* – hypoxantin-fosforibosyl-transferáza 1; *B2M* - β-2-mikroglobulin; *SURF1* - surféit 1; *TBP* - TATA box vázající protein.



Graf č. 3: Rozdíly v Ct hodnotách jednotlivých housekeepingových genů u kontrolních vzorků jaterní tkáně a vzorků po ovlivnění trijodtyroninem.



A



B

Obr. č. 35: **A** – Amplifikační křivky real-time PCR pro surfeit 1 plazmidových standardů a vzorků. **B** – Kalibrační křivka pro surfeit 1 vytvořená pomocí plazmidu. Modré body – kalibrační standardy o koncentraci jednotlivých bodů: $1,0 \cdot 10^{10}$ kopií/ml; $1,0 \cdot 10^9$ kopií/ml; $1,0 \cdot 10^8$ kopií/ml; $1,0 \cdot 10^7$ kopií/ml; $1,0 \cdot 10^6$ kopií/ml; $1,0 \cdot 10^5$ kopií/ml; $1,0 \cdot 10^4$ kopií/ml, červené body – jednotlivé analyzované vzorky.

4.2.2.5. Výsledky exprese UCP2 v jaterní tkáni po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu

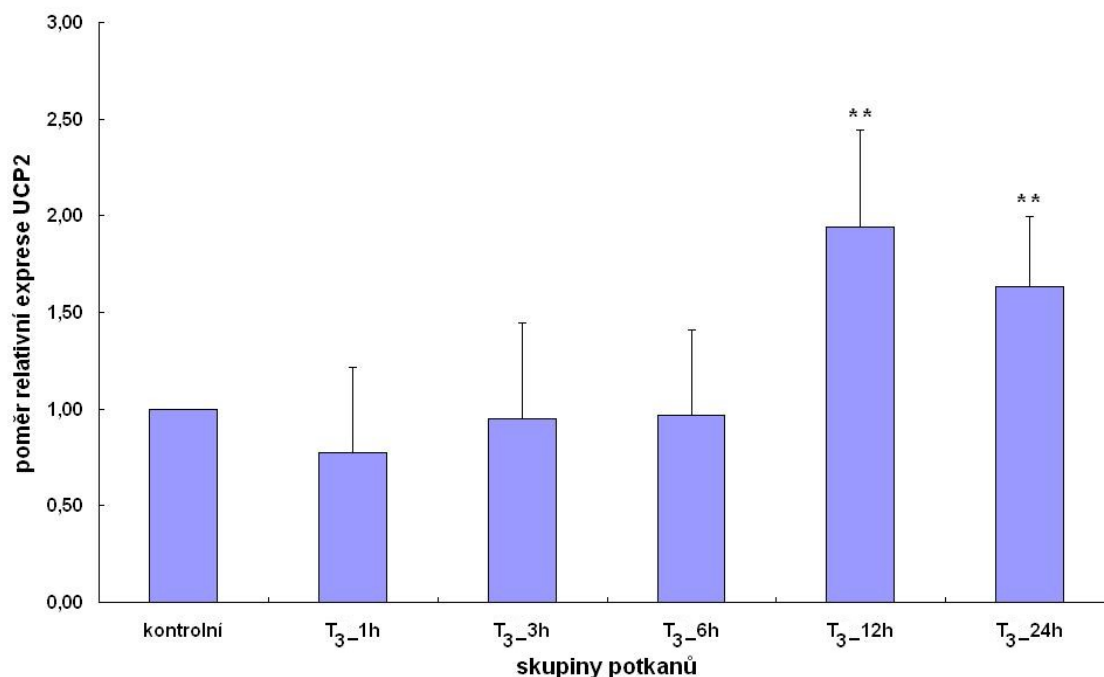
Po dokončení optimalizace metody jsme provedli pokusy zaměřené na indukci exprese UCP2 v játrech v časových intervalech 1, 3, 6, 12 a 24 hodin po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu. V jaterní tkáni jsme u kontrolní skupiny detekovali nízké množství mRNA UCP2. V porovnání se vzorky sleziny, které jsme analyzovali v rámci zavedení a optimalizace real-time PCR specifické pro UCP2 a surfeit 1, jsme zjistili, že se jedná o přibližně 65× nižší expresi UCP2. Ta byla následně jednu hodinu po aplikaci jedné dávky T₃ snížena o 22 % oproti kontrolní skupině, avšak tento pokles nebyl signifikantní. Později exprese mRNA UCP2 dosáhla úrovně kontrolních vzorků a teprve 12 hodin po aplikaci T₃ jsme stanovili maximum exprese. Jednalo se o téměř 2-násobné zvýšení, které bylo statisticky signifikantní na hladině významnosti 99 %. Po dalších 12 hodinách došlo k poklesu hladiny na 1,63-násobek proti kontrole ($p < 0,01$ vs. kontrolní skupina). To znamená, že mezi 12 a 24 hodinou od aplikace T₃ došlo pouze k pozvolnému poklesu a lze se tedy domnívat, že snížení exprese na původní hodnoty bude velice pomalé. Výsledky sledování kinetiky exprese mRNA UCP2 jsou zobrazeny na grafu č. 4 a shrnuty v tabulce č. 15.

Tab. č. 15: Změny v expresi mRNA UCP2 a koncentraci celkového trijodtyroninu (tT₃) a volného trijodtyroninu (fT₃) po i. p. aplikaci jedné dávky trijodtyroninu.

Skupina	n	UCP2 mRNA ¹	tT ₃ (nmol/l) ²	fT ₃ (pmol/l) ²
kontrolní	12	1,00	1,62 ± 0,13	8,24 ± 0,32
T ₃ _1h	12	0,78 ± 0,44 ^N	133,00 ± 9,90 ***	496,00 ± 8,49 ***
T ₃ _3h	12	0,95 ± 0,49 ^N	198,00 ± 26,87 ***	631,00 ± 16,97 ***
T ₃ _6h	12	0,97 ± 0,44 ^N	126,00 ± 19,80 ***	460,00 ± 57,98 ***
T ₃ _12h	12	1,94 ± 0,50 **	57,95 ± 1,06 ***	163,50 ± 14,85 ***
T ₃ _24h	12	1,63 ± 0,36 **	18,60 ± 1,70 ***	65,93 ± 0,04 ***

Pozn.: ¹Hodnoty relativní kvantifikace exprese UCP2 (průměr ± směrodatná odchylka).

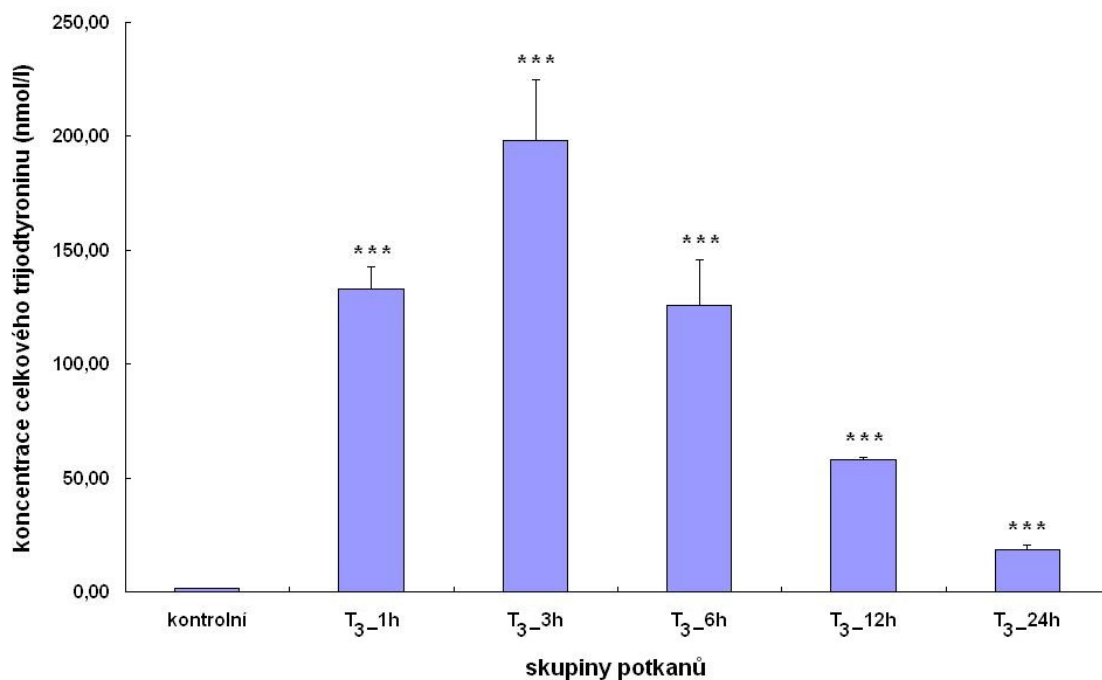
²Hodnoty koncentrace tT₃ a fT₃ jsou vypočítány jako průměr ± směrodatná odchylka. ^N – statisticky nevýznamné; ** $p < 0,01$ vs. kontrolní skupina; *** $p < 0,001$ vs. kontrolní skupina.



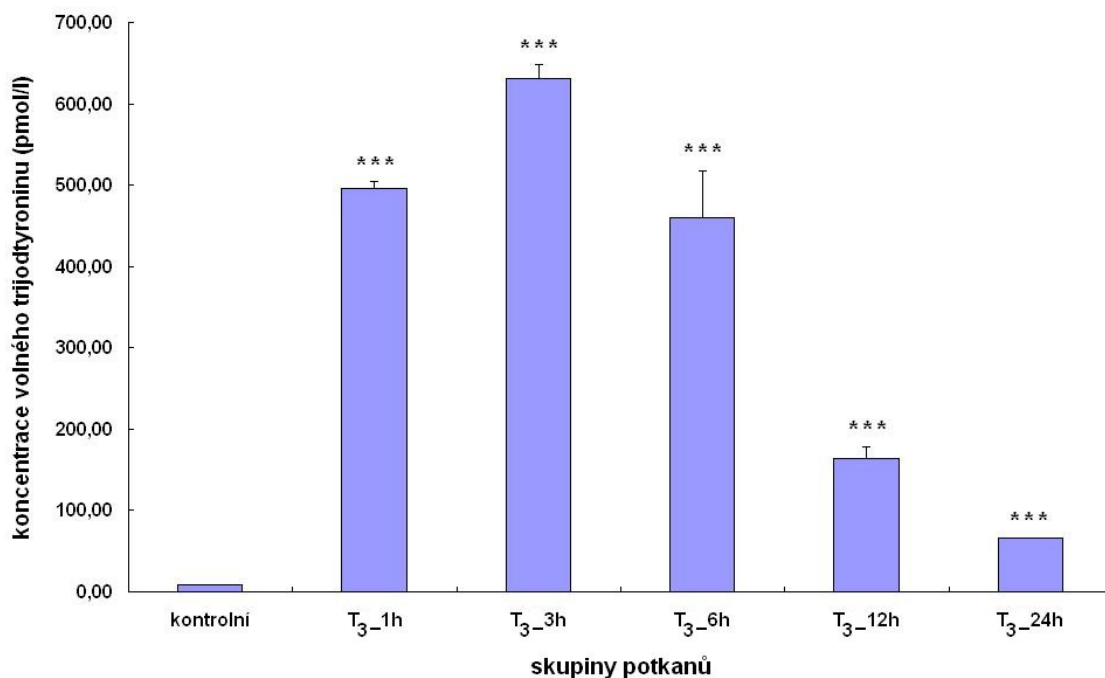
Graf č. 4: Efekt jedné dávky trijodtyroninu na expresi mRNA UCP2 v jaterní tkáni potkanů. Výsledky byly vyhodnoceny metodou relativní kvantifikace a mRNA UCP2 byla normalizována k referenčnímu genu surfeit 1. ** $p < 0,01$ vs. kontrolní skupina.

Ve stejných časových intervalech jsme sledovali rovněž koncentrace celkového a volného trijodtyroninu, abychom si mohli udělat obraz kinetiky změny koncentrace trijodtyroninu v séru po jeho aplikaci. Jak ukazuje graf č. 5 a 6 a tabulka č. 15, sérové koncentrace tT_3 a fT_3 stoupají velmi rychle již během prvních třech hodin, kdy jsme zjistili maximální hodnoty. V případě celkového trijodtyroninu jsme zjistili signifikantní 122-násobek koncentrace oproti kontrolní skupině ($p < 0,001$) a pro volný T_3 77-násobek ($p < 0,001$). Oba parametry poté postupně klesají, přesto po 24 hodinách od aplikace hormonu jsou koncentrace oproti kontrolám stále signifikantně zvýšené (11-násobek koncentrace tT_3 a 8-násobek u fT_3). Na grafech č. 5 a 6 je vidět také shodný průběh kinetiky koncentrací celkového i volného T_3 se zvýšením během prvních hodin, maximum ve třetí hodině, a následně relativně rychlým poklesem.

Celkově lze říci, že maximum koncentrací T_3 a fT_3 je ve třetí hodině, oproti tomu exprese UCP2 dosahuje svého maxima až o 9 hodin později, tj. ve 12. hodině po aplikaci hormonu. Hodina, kdy hodnota mRNA UCP2 byla maximální, je shodná jako u modelového systému, tedy u mRNA mGPDH.



Graf č. 5: Sérové koncentrace celkového trijodtyroninu (T₃) u kontrolní skupiny a skupin potkanů po aplikaci jedné dávky T₃ během 24 hodin. *** $p < 0,001$ vs. kontrolní skupina.



Graf č. 6: Sérové koncentrace volného trijodtyroninu (fT₃) u kontrolní skupiny a skupin potkanů po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu během 24 hodin. *** $p < 0,001$ vs. kontrolní skupina.

4.2.2.6. Výsledky exprese UCP2 v jaterní tkáni po aplikaci tří dávek trijodtyroninu

Stejně pokusy jsme provedli ještě jednou, ale tentokrát jsme potkanům podávali tři dávky trijodtyroninu. V časových intervalech 1, 3 a 6 hodin jsme zjistili statisticky nevýznamné snížení a ve 12 hodině statisticky nevýznamné 0,15-násobné zvýšení. Pouze 24 hodin po poslední aplikaci hormonu jsme pozorovali 0,33-násobné snížení mRNA UCP2 ($p < 0,01$) oproti kontrolní skupině (tabulka č. 16 a graf č. 7).

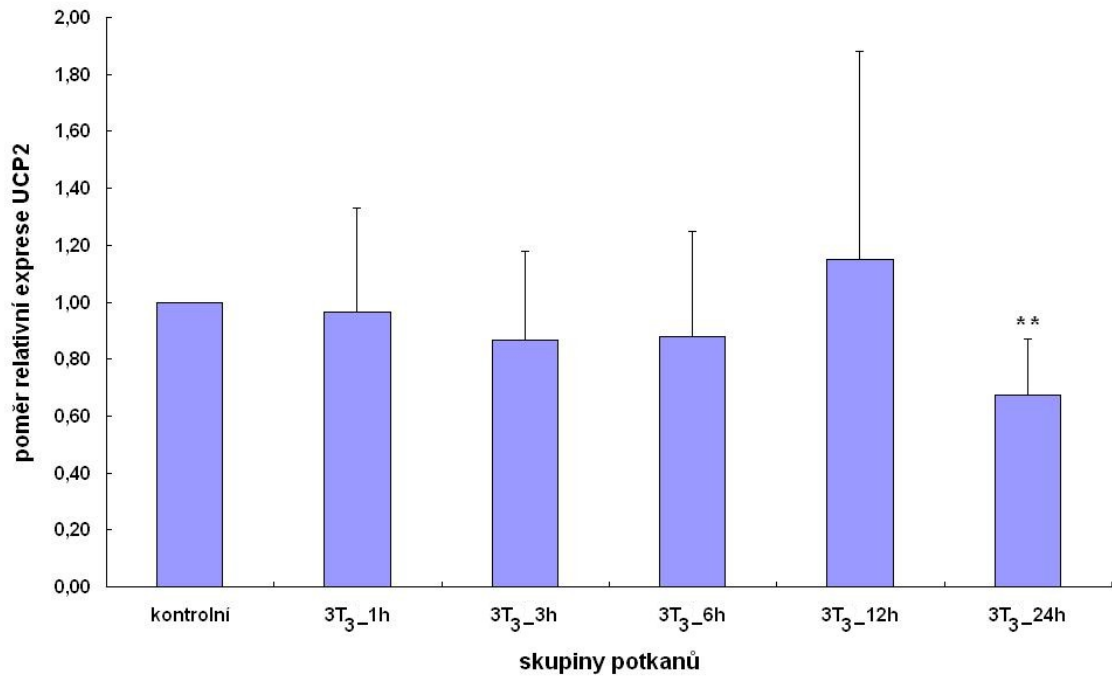
Tab. č. 16: Změny v expresi mRNA UCP2 a koncentraci celkového trijodtyroninu (tT_3) a volného trijodtyroninu (fT_3) po i. p. aplikaci tří dávek trijodtyroninu.

Skupina	n	UCP2 mRNA ¹	tT_3 (nmol/l) ²	fT_3 (pmol/l) ²
kontrolní	12	1,00	1,93 ± 0,04	5,40 ± 0,14
3T ₃ _1h	12	0,96 ± 0,37 N	34,05 ± 14,08 ***	61,88 ± 0,86 ***
3T ₃ _3h	12	0,87 ± 0,31 N	46,42 ± 32,05 ***	207,90 ± 71,71 ***
3T ₃ _6h	12	0,88 ± 0,37 N	64,02 ± 1,87 ***	254,33 ± 10,28 ***
3T ₃ _12h	12	1,15 ± 0,73 N	17,74 ± 11,79 ***	54,79 ± 24,73 ***
3T ₃ _24h	12	0,67 ± 0,20 **	3,30 ± 1,84 **	7,25 ± 0,92 **

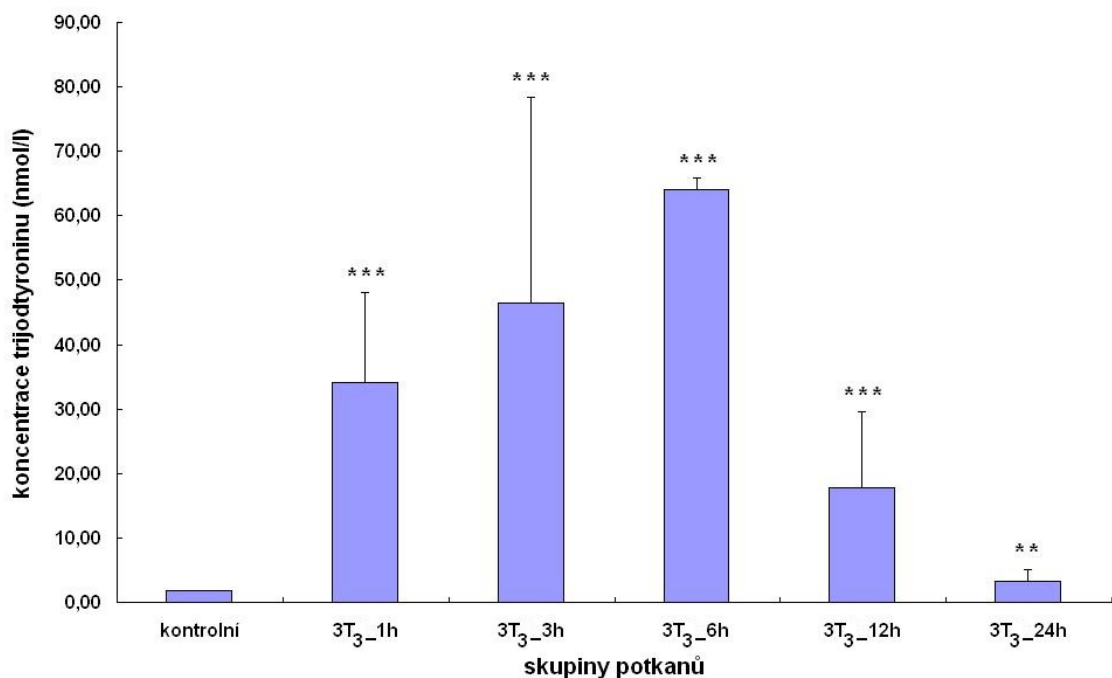
Pozn.: ¹Hodnoty relativní kvantifikace exprese UCP2 (průměr ± směrodatná odchylka).

²Hodnoty koncentrace tT_3 a fT_3 jsou vypočítány jako průměr ± směrodatná odchylka. ^N – statisticky nevýznamné; ** $p < 0,01$ vs. kontrolní skupina; *** $p < 0,001$ vs. kontrolní skupina.

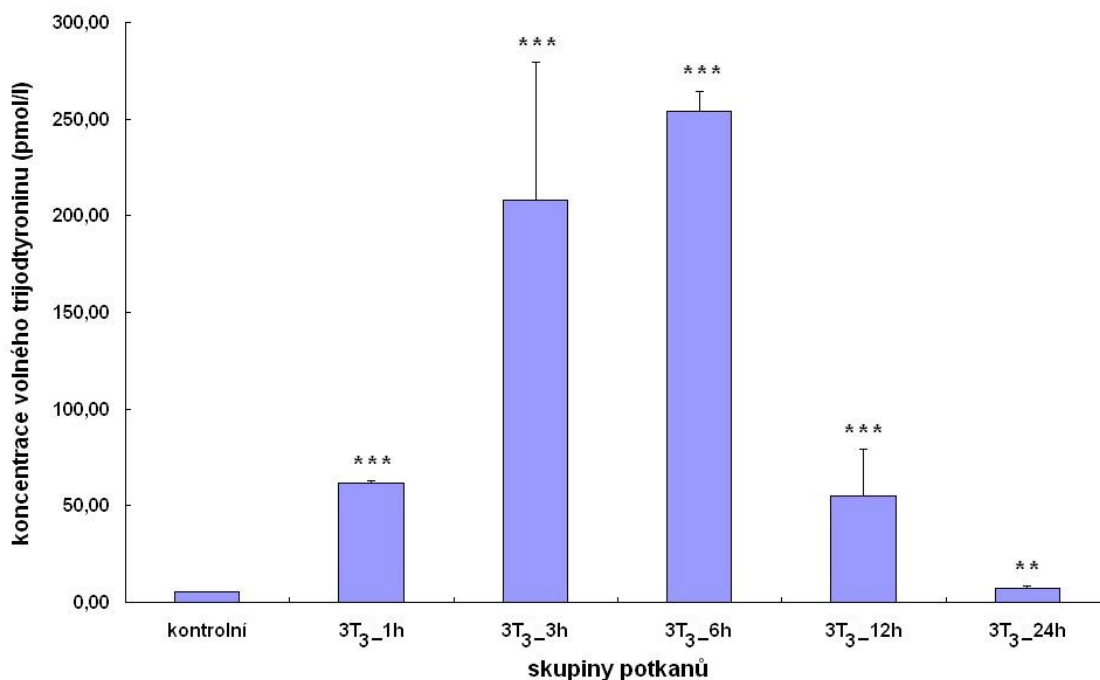
Opět jsme sledovali i koncentrace celkového i volného trijodtyroninu (tabulka č. 16 a grafy č. 8 a 9). Oproti pokusům s jednou dávkou T₃ jsme pozorovali méně výrazné zvýšení koncentrací. Maximální hodnota tT_3 byla v případě tří dávek 33-násobná oproti 122-násobku u jedné dávky a u fT_3 47-násobek vs. 77-násobek. Navíc maximum bylo zjištěno až 6 hodin po aplikaci poslední dávky, což je o tři hodiny později než při podání jedné dávky hormonu. Tyto rozdíly mohou být pravděpodobně důvodem nevýznamné změny mRNA UCP2 v prvních 12 hodinách. Po 24 hodinách dosahují hodnoty tT_3 a fT_3 pouze přibližně 1,7-násobku, resp. 1,3-násobku hodnot u kontrolní skupiny.



Graf č. 7: Efekt tří dávek trijodtyroninu na expresi mRNA UCP2 v jaterní tkáni potkanů. Výsledky byly vyhodnoceny metodou relativní kvantifikace a mRNA UCP2 byla normalizována k referenčnímu genu surfeit 1. ** $p < 0,01$ vs. kontrolní skupina.



Graf č. 8: Sérové koncentrace celkového trijodtyroninu (tT₃) u kontrolní skupiny a skupin potkanů po aplikaci tří dávek T₃ během 24 hodin. ** $p < 0,01$ vs. kontrolní skupina, *** $p < 0,001$ vs. kontrolní skupina.



Graf č. 9: Sérové koncentrace celkového trijodtyroninu (tT₃) u kontrolní skupiny a skupin potkanů po aplikaci tří dávek T₃ během 24 hodin. ** $p < 0,01$ vs. kontrolní skupina, *** $p < 0,001$ vs. kontrolní skupina.

4.2.2.7. Výsledky exprese UCP2 v jaterní tkáni po parciální hepatektomii

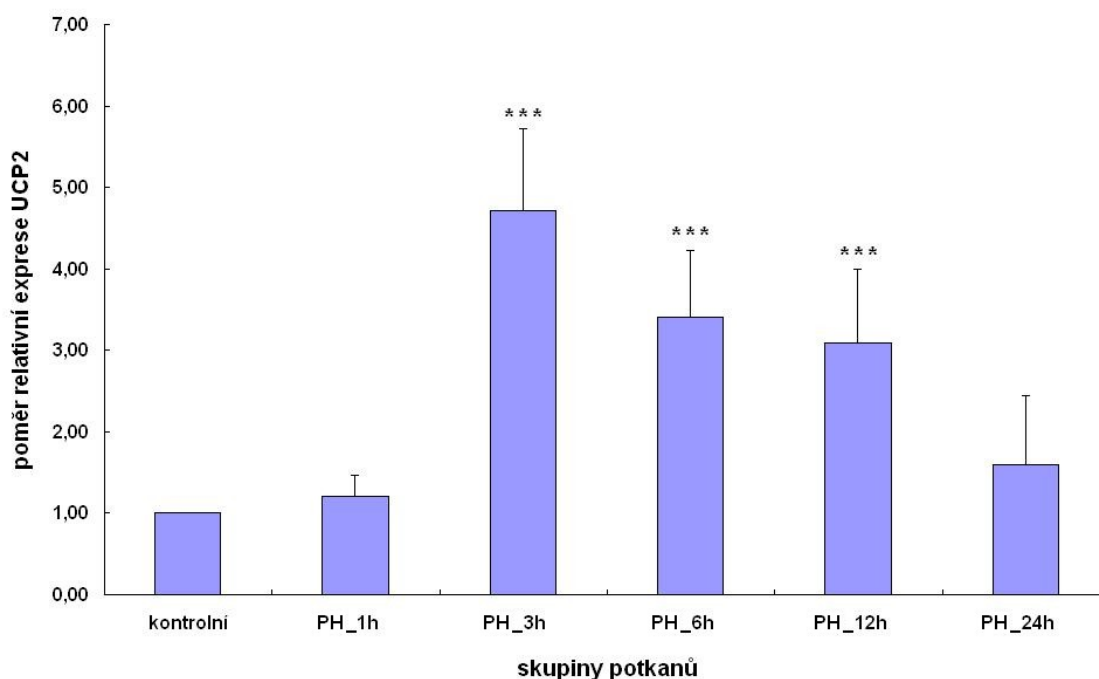
V poslední části práce jsme ověřovali expresi mRNA UCP2 v jaterní tkáni potkana po parciální (2/3) hepatektomii. Protože se jedná o proliferační děj vyžadující značné množství energie, což vede ke zvýšené tvorbě reaktivní kyslíkových radikálů, zajímalo nás, jak vypadá exprese UCP2, která by mohla být významným ochranným mechanismem. Jako v předešlých pokusech jsme sledovali kinetiku exprese UCP2 v časových intervalech 1, 3, 6, 12 a 24 hodin po provedení parciální hepatektomie.

Jak ukazuje tabulka č. 17 a graf č. 10, již v první hodině dochází ke zvýšení exprese, která je prozatím statisticky nevýznamná. Ale již 3 hodiny po parciální hepatektomii jsme pozorovali maximální zvýšení (4,71-násobný vzrůst mRNA UCP2 oproti kontrolní skupině). Poté dochází k pozvolnému poklesu exprese UCP2 na 3,40× a 3,09× vs. kontrolní skupina po 6 a 12 hodinách. V dalších 12 hodinách pak mRNA UCP2 klesá téměř o dvojnásobek na 1,59-násobek vůči kontrole, což už je opět statisticky nevýznamný rozdíl.

Tab. č. 17: Změny v expresi mRNA UCP2 po parciální hepatektomii.

Skupina	n	UCP2 mRNA*	Statistická významnost
kontrolní	5	1,00	---
PH_1h	5	1,21 ± 0,26	nevýznamné
PH_3h	5	4,71 ± 1,01	*** $p < 0,001$
PH_6h	5	3,40 ± 0,82	*** $p < 0,001$
PH_12h	5	3,09 ± 0,91	*** $p < 0,001$
PH_24h	5	1,59 ± 0,85	nevýznamné

Pozn.: * Hodnoty relativní kvantifikace exprese UCP2 (průměr ± směrodatná odchylka).



Graf č. 10: Efekt parciální hepatektomie na expresi mRNA UCP2 v jaterní tkáni potkanů. Výsledky byly vyhodnoceny metodou relativní kvantifikace a mRNA UCP2 byla normalizována k referenčnímu genu surfeit 1. *** $p < 0,001$ vs. kontrolní skupina.

5. Diskuze

Játra jsou multifunkčním orgánem, který hraje klíčovou roli v intermediárním a energetickém metabolismu, biotransformaci, sekreci a exkreci. Tyto procesy jsou energeticky velmi náročné, proto se jedná o tkáň vysoce závislou na obsahu kyslíku a metabolicky velmi aktivní (Červinková et al., 2007). Játra mají tedy důležitou roli v regulaci metabolismu různých energetických substrátů, rychle se přizpůsobují nadměrnému přísunu substrátů snížením účinnosti mitochondriální ATP produkce. Některé studie rovněž ukazují, že hepatocyty se adaptují na zvýšený přísun substrátů (např. lipidů) indukcí exprese proteinů, ale i mRNA UCP2 (Cortez-Pinto et al., 1999).

Játra jsou také orgánem často používaným pro studium účinků tyroidních hormonů, které se uplatňují v široké řadě biologických procesů. Hormony štítné žlázy mají důležitou roli v regulaci savčího energetického metabolismu a růstu a ve farmakologických koncentracích indukují odpřažení oxidační fosforylace. Efekt přisuzovaný trijodtyroninu se děje na úrovni transkripční a post-transkripční regulace cílových genů kódujících komponenty mitochondriálního energetického aparátu. Trijodtyronin tedy ovlivňuje i expresi UCP2 v metabolicky aktivních tkáních jako například v srdci, ledvinách, kosterních svalech a játrech (Lanni et al., 1997). Přestože byl vliv trijodtyroninu na expresi UCP2 popsán již před řadou let, stále existuje málo informací o změně mRNA UCP2 během prvních hodin po aplikaci tohoto hormonu.

Hlavním cílem této práce proto bylo studium vlivu jednorázového a opakovaného podání trijodtyroninu na indukci mRNA UCP2 v jaterní tkáni během prvních 24 hodin po aplikaci hormonu. V první fázi naší práce bylo nutné zjistit, jaké časové intervaly by bylo vhodné sledovat. Proto jsme se rozhodli využít jako modelový systém mitochondriální glycerofosfátdehydrogenázu (mGPDH), u které jsme sledovali její biogenezi až do 72 hodin po aplikaci jedné dávky a tří dávek trijodtyroninu (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti). Provedli jsme stanovení aktivity mGPDH pomocí spektrofotometrické metody, obsahu mRNA mGPDH pomocí northern blotu a také stanovení obsahu samotného proteinu western blotem. V další části jsme se soustředili na zavedení a optimalizaci metody pro zjištění exprese UCP2 v jaterní tkáni (izolaci RNA, reverzní transkripci a real-time PCR pro relativní kvantifikaci RNA UCP2). Po zavedení metody jsme následně sledovali mRNA UCP2 v intervalech 1, 3, 6, 12 a 24 hodiny po i. p. aplikaci jedné resp. tří dávek trijodtyroninu, což nám umožnilo popsat

změnu exprese UCP2 v čase. Nakonec jsme se rozhodli ještě zjistit expresi UCP2 po parciální (2/3) hepatektomii v intervalech 1, 3, 6, 12 a 24 hodiny po provedení zákroku.

Mitochondriální glycerofosfátdehydrogenáza je flavoprotein dependentní enzym, který je vázán na povrchu vnitřní mitochondriální membrány a je součástí glycerofosfátového cyklu (Brown et al., 1994). Aktivita tohoto cyklu závisí především na množství mGPDH v mitochondriích jednotlivých tkání, které se značně liší (Koza et al., 1996). Není stále vyjasněna otázka, proč je exprese tohoto enzymu ve většině tkání v organismu potlačena a proč pouze v některých tkáních je aktivita mGPDH vysoká. Exprese mGPDH je silně potlačena ve většině savčích tkání (Weitzel et al., 2000). Vysoký obsah se nachází pouze v hnědé tukové tkáni (Housteck et al., 1975) a mnohem méně, ale stále významné aktivity se nalézají v placentě (Swierczynski et al., 1976), varlatech, pankreatických β -buňkách (MacDonald a Brown, 1996) a kultivovaných fibroblastech (Chowdhury et al., 2000). Naopak nízký obsah mGPDH se nachází v jaterní tkáni, kde však byla popsána indukce enzymu působením tyroidních hormonů (Dümmeler et al., 1996). Detailní mechanismus jejich působení není stále dobře pochopen vzhledem složitosti této regulace.

Různé aspekty indukce mGPDH pomocí trijodtyroninu byly již rozsáhle studovány (Oppenheimer et al., 1977; Garrib a McMurray, 1988; Clay a Ragan, 1989; Lanni et al., 1995; Weitzel et al., 2000). Nicméně naše výsledky komplexně srovnávají obsah mRNA mGPDH a množství proteinu s enzymovou aktivitou mGPDH. Potvrdili jsme předchozí nálezy, které ukazují specifické působení tyroidních hormonů na mGPDH. Použitím specifických protilátek jsme také mohli popsat proporcionální vzrůst obsahu mGPDH proteinu, a to po jedné i třech dávkách trijodtyroninu.

V našich experimentech jsme používali model indukce biogeneze mGPDH po jedné dávce trijodtyroninu eutyroidním potkanům. Kvůli jednoduchosti tohoto systému jsme mohli sledovat kinetiku enzymové biogeneze. Ačkoliv indukce enzymové aktivity mGPDH po jedné dávce trijodtyroninu již byla studována Oppenheimerem a spol. (1977), kteří zjišťovali kinetiku změny enzymové aktivity. Pro zajištění plného obsazení tyroidních receptorů používali vysoké dávky trijodtyroninu (200 nebo 5000 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ tělesné hmotnosti). Enzymová aktivita v jejich pokusech začínala stoupat 13 hodin po aplikaci hormonu a rostla, dokud bylo více než 95 % tyroidních receptorů obsazeno trijodtyroninem. Dále také studovali úbytek aktivity mGPDH a spočítali tak poločas degradace enzymu na 2,8 dne. Tato data celkově korespondují s našimi nálezy. Na

rozdíl od Oppenheimerera jsme však použili o 1 až 2 řády nižší koncentrace trijodtyroninu (20 µg/100 g tělesné hmotnosti), která by se mohla lépe podobat situaci při hypertyreóze. Z tohoto důvodu je míra indukce mGPDH v našich experimentech nižší. Při porovnání našich dat po jedné nebo třech dávkách je evidentní, že nepracujeme v koncentracích trijodtyroninu, kdy jsou jejich tyroidní receptory plně saturované.

Při opakované aplikaci trijodtyroninu jsme stanovili, že hormonální indukce mGPDH způsobuje tří- až čtyř-násobné zvýšení aktivity tohoto enzymu v jaterních homogenátech i mitochondriích. Müller a Seitz (1994) zjistili pomocí kvantitativní PCR reakce mRNA daného enzymu, že trijodtyronin zvyšuje syntézu této nukleové kyseliny. Ta poté putuje k ribozomům, kde dochází k translaci a vzniku zvýšeného množství specifického proteinu. Vzestup aktivity mGPDH je tedy vysvětlován syntézou *de novo*.

Dále jsme zjistili, že mGPDH transkript je indukován již 3 až 6 hodin po aplikaci jedné dávky trijodtyroninu (maximum indukce je ve 12 hodině). Tento náález je podobný výsledkům Dümmlera a spol. (1996), kteří objevili zvýšení po 4 až 6 hodinách. Transkript mGPDH je proto nejčasnější ze všech mitochondriálních proteinů, které jsou kódovány buněčným jádrem a které jsou indukovány trijodtyroninem. Navíc se tato rychlost více podobá cytosolovým proteinům regulovaným trijodtyroninem (např. malátdehydrogenáza, glukokináza) (Petty et al., 1990; Dümmler et al., 1996). Transkripce mGPDH genu je aktivována pomocí TR/RXR vazby k sekvenci responsivního elementu pro tyroidní hormony (TRE) v promotorové oblasti genu (Yen a Chin, 1994; Weitzel et al., 2001 A). Časný charakter změny exprese mRNA mGPDH naznačuje, že patří do rodiny na trijodtyronin rychle odpovídajících transkriptů indukovaných přímo pomocí vázaných tyroidních receptorů. Další mechanismus působení trijodtyroninu je prostřednictvím indukce transkripce a následné syntézy jiných transkripčních faktorů nebo koaktivátorů zapojených v mitochondriální biogenezi (např. NRF-1 nebo PGC-1) (Weitzel et al., 2003; Lanni et al., 2003). Geny regulované tímto způsobem reagují na trijodtyronin po mnohem delší době (48 hodin) potřebné pro uskutečnění všech pomocných procesů (Weitzel et al., 2001 B; Weitzel et al., 2003). Časná indukce mGPDH transkriptu proto mluví proti zapojení takovéto dráhy v regulaci biogeneze mGPDH.

Další důležité hledisko naší studie je hodnocení změny mGPDH proteinu. Až dosud bylo publikováno málo studií pojednávajících o změně mitochondriálních proteinů (Costantino a Attardi, 1975; Lipsky a Pedersen, 1981; Hare a Hodges, 1982). Ve skutečnosti detailní analýza poločasu rozpadu mitochondriálních OXPHOS enzymů a

dalších proteinů z různých mitochondriálních částí, stejně jako údaje o tkáňové specifitě, stále chybí. Některé studie dokladují, že za degradaci mitochondrií je zodpovědný proces makroautofágie (Grisolia et al., 1985; Hare, 1990). Kvantitativní studie v jaterních buňkách naznačují, že makroautofágie by mohla být zodpovědná za degradaci ne více než poloviny mitochondriálních proteinů (Grisolia et al., 1985). Studie na jaterní tkáni, kultivovaných hepatocytech nebo buňkách nádoru jater uvádějí, že poločas rozpadu mitochondriálních proteinů je velmi variabilní v rozmezí od 1,2 hodiny do 185 hodin pro matrixové proteiny a v rozmezí 35 až 156 hodin pro membránové proteiny (Hare a Hodges, 1982; Russell a Mayer, 1983; Tanner a Dice, 1996). To svědčí o selektivní degradaci bílkovin, které již nejsou déle potřebné pro mitochondriální funkci, pravděpodobně pomocí příslušníků AAA-proteázové rodiny (Kaser a Langer, 2000). Z našich pokusů měření enzymové aktivity můžeme odhadnout, že poločas rozpadu mGPDH může být přibližně 60 hodin. Tento relativně rychlý obrat naznačuje možnou existenci dráhy selektivní degradace, která by mohla fungovat k zajištění rychlejšího rozpadu mGPDH v porovnání s jinými proteiny vnitřní mitochondriální membrány.

V další fázi naší práce jsme zavedli a optimalizovali metody pro studium exprese UCP2. Rozhodli jsme se využít metodu reverzní transkripce s následnou real-time PCR, které nám umožnily kvantitativně sledovat změny exprese mRNA UCP2. Výhodou této metody je výrazná selektivita a rozlišení, které není možné dosáhnout pomocí northern blotu (Alán et al., 2009). Navíc můžeme stanovovat expresi UCP2 v rozmezí několika řádů. Podmínkou však je nutnost důkladného návrhu primerů a sondy. V našem případě jsme primery navrhli tak, aby měly exon-exonové uspořádání. To znamená, že jeden primer se nachází na 5. exonu UCP2 genu a druhý primer začíná na 6. exonu a končí na 7. exonu. Toto uspořádání tak zabrání detekovat místo RNA (resp. cDNA) genomickou DNA. Specifitu real-time PCR navíc zvyšuje i využití hydrolytické sondy, která hybridizuje v určitém místě mezi prvním a druhým primerem. Produkt vzniklý během PCR byl ještě navíc ověřen pomocí sekvenace s výsledkem, že plně odpovídá UCP2. Pro kvantifikaci RNA UCP2 jsme využili metodu relativní kvantifikace. Nejprve jsme však museli zjistit optimální referenční gen tak, aby vykazoval minimální změny exprese mezi kontrolní skupinou a jednotlivými experimentálními skupinami a jeho průměrná Ct hodnota by měla být co nejbližší Ct hodnotě sledovaného genu. V našem případě se jednalo o housekeepingový gen *surfeit 1*. Další podmínkou úspěšného sledování exprese RNA UCP2 je použití stejného metodického postupu, tj. odběru

vzorků vždy ze stejného místa a jejich další zpracování za stejných podmínek u všech vzorků. Z tohoto důvodu jsme vypracovali pro naše experimenty důkladné metodické postupy. Přesto je nutné ale mít na paměti, že úroveň exprese RNA UCP2 nemusí být přímo úměrná expresi UCP2 proteinu.

Pro optimalizaci real-time PCR specifické pro UCP2 jsme využili vzorky sleziny z kontrolních neovlivněných potkanů, kde byla popsána výrazná exprese UCP2 (Larrouy et al., 1997; Négre-Salvayre et al., 1997). Díky tomu jsme mohli porovnat míru exprese ve vzorcích sleziny a jaterní tkáně a zjistili jsme, že hladina mRNA UCP2 je výrazně vyšší ve slezině než v játrech. Větší množství UCP2 transkriptu ve slezině je možné vysvětlit vysokým obsahem makrofágů, v případě jater se popisuje výskyt zejména v Kupfferových buňkách (Larrouy et al., 1997; Fleury a Sanchis, 1999). Rozdílnost exprese v játrech a slezině jsme ověřili výsledky studie, kterou provedli Alán a spol. Ti sledovali množství mRNA UCP2 v osmi tkáních u potkanů a zjistili, že obsah UCP2 se snižuje v následujícím pořadí - slezina, srdce, plíce, bílá tuková tkáň, mozek, kosterní svalstvo, ledvina a játra, v obsahu UCP2 transkriptu navíc pozorovali 30-násobný rozdíl v obsahu (Alán et al., 2009).

Při sledování exprese RNA UCP2 po ovlivnění jednou dávkou trijodtyroninu (20 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti) jsme zjistili, že nejprve dochází k mírnému nesignifikantnímu poklesu, který je následován výrazným vzestupem. Po 12 hodinách od podání trijodtyroninu dochází k maximálnímu téměř k dvojnásobnému zvýšení exprese mRNA UCP2. Za dalších 12 hodin však dochází pouze k malému poklesu exprese. Lze tedy říci, že po dosažení maximální exprese dochází k jejímu velmi pozvolnému návratu na původní hodnoty. Naše výsledky jsou podobné výsledkům studie, kterou provedli Voci a spol. (2001). Na Kupfferových buňkách izolovaných z jater eutyroidních a hypertyreózních potkanů zjistili, že hladiny mRNA UCP2 závisí na délce trvání působení trijodtyroninu. Ve svých pokusech použili rovněž intraperitoneální jednorázovou aplikaci trijodtyroninu v dávce 25 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti a potkany usmrtili 48 hodin po podání. U kontrolních vzorků pomocí northern blotu jasně detekovali mRNA UCP2, která byla po ovlivnění trijodtyroninem u experimentálních vzorků více než dvojnásobná. Rychlá změna exprese mRNA UCP2 opět naznačuje, že patří do rodiny na trijodtyronin rychle odpovídajících transkriptů, které jsou indukovány přímo pomocí vázaných tyroidních receptorů. Rychlost exprese UCP2 však souvisí i s jeho stabilitou. Rousset a spol. (2007) studovali na různých buněčných liniích počas rozpadu UCP2 proteinu a zjistili, že je velmi nestabilní.

K rozpadu UCP2 totiž dochází přibližně po 30 minutách oproti UCP1, kde to je až po 30 hodinách. Takto výrazný rozdíl vysvětlili tím, že teplo tvořené UCP1 v v hnědé tukové tkáni je zpravidla dlouhodobý a adaptivní jev, zatímco řízení tvorby kyslíkových radikálů v mitochondriích pomocí UCP2 vyžaduje spíše jemnou regulaci (Rousset et al., 2007).

Voci a spol. (2001) v další části svých pokusů aplikovali potkanům intraperitoneálně trijodtyronin v dávce 15 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti každý den po dobu 3 týdnů, čímž navodili chronický hypertyreózní stav. U těchto potkanů ale zjistili pouze 30% nesignifikantní vzrůst exprese UCP2. Tento vzrůst byl ve srovnání se vzorky po akutním ovlivnění signifikantně nižší. Také Lanni a spol. (1997) prováděli studii, ve které i. p. aplikovali potkanům trijodtyronin v dávce 15 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti po dobu 7 dní a usmrtili je 24 hodin po poslední dávce, a zjistili, že trijodtyronin výrazně ovlivňuje expresi mRNA UCP2 v srdci, menší efekt pozorovali u kosterního svalstva. V případě ledvin a jater však zjistili, že trijodtyronin zde téměř nepůsobí. Podobné výsledky jsme pozorovali i my u vzorků po aplikaci 3 dávek trijodtyroninu (20 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti), kdy jsme v prvních 12 hodinách po podání zjistili nesignifikantní změny exprese. Pouze 24 hodin po aplikaci jsme sledovali signifikantní pokles mRNA UCP2 na 67 % oproti kontrole. Voci a spol. (2001) sledovali kromě vlivu trijodtyroninu na expresi RNA UCP2 také respirační parametry mitochondrií (např. celkový respirační poměr, ATP syntézu, únik protonů atd.) a zjistili, že u akutního podání trijodtyroninu dochází k velmi patrnému zvýšení příspěvku způsobeného únikem protonů k celkové buněčné respiraci. Nicméně u chronicky hypertyreózních potkanů, kteří měli oproti akutním hypertyreózním potkanům nižší expresi mRNA UCP2, pozorovali signifikantně vyšší příspěvek vytvořený únikem protonů na celkové respiraci. Pravděpodobným vysvětlením může být, že při akutním působení trijodtyroninu zvýšení UCP2 transkriptu nevede k obdobnému zvýšení koncentrace UCP2 proteinu v mitochondriích. Naopak při chronickém ovlivnění se zvyšuje i exprese UCP2 proteinu. Tyto výsledky mohou být ve shodě s pravděpodobným efektem UCP2 v odpřažení oxidační fosforylace a mohou tak naznačit roli Kupfferových buněk v jaterní termogenezi (Voci et al., 2001).

Z výsledků exprese mRNA mGPDH a UCP2 je rovněž patrné, že v obou případech dochází ke zvýšení exprese ve stejném časovém intervalu – tedy 12 hodin po aplikaci trijodtyroninu (20 $\mu\text{g}/100$ g tělesné hmotnosti), a poté dochází v obou případech

k pozvolnému poklesu. Změnu exprese RNA UCP2 v čase v hepatocytech potkanů sledovali také Cortez-Pinto a spol. (1999) po inkubaci s 6% Intralipidem (emulze sojového oleje, kde se nachází v poměru 2:1 kyselina linolová a olejová). U kontrolních hepatocytů pozorovali malou expresi UCP2, u hepatocytů po ovlivnění Intralipidem docházelo k bifázickému zvýšení hladiny mRNA UCP2. Nejprve po 0,5 hodině pozorovali mírné zvýšení následované poklesem k bazálním hodnotám ve 3 a 6 hodině. Další časový interval byl až 24 hodin po ovlivnění, kdy došlo téměř až k 3,5-násobnému zvýšení. Jistě zajímavé by proto bylo porovnání exprese UCP2 po 12 hodinách, přesto lze předpokládat, že časový průběh exprese byl velmi podobný našim výsledkům pro mGPDH i UCP2.

Zvýšení UCP2 transkriptu v jaterní tkáni by mohlo být vysvětleno zvýšením energetického výdeje a metabolismu, který může být indukován a regulován tyroidními proteiny během odpáření oxidační fosforylace. Zvýšený energetický výdej a metabolismus rovněž indukuje zvýšení produkce reaktivních kyslíkových radikálů, jež jsou signálem pro up-regulaci UCP2 transkriptu a proteinu v hepatocytech. Důkaz, že trijodtyronin zvyšuje mitochondriální produkci kyslíkových radikálů (Barbe et al., 2001), podporuje předpoklad, že indukce UCP2 v játrech je fyziologicky antioxidačním mechanismem ochrany proti zvýšené produkci ROS.

V naší studii jsme kromě sledování změny exprese UCP2 po aplikaci trijodtyroninu stanovovali rovněž koncentrace celkového a volného trijodtyroninu v séru. Po aplikaci jedné dávky jsme u tT_3 i fT_3 zjistili maximální hodnoty již po 3 hodinách, kdy u celkového trijodtyroninu došlo ke 122-násobnému zvýšení a u volného trijodtyroninu k 77-násobnému vzrůstu. Při opakovaném podání trijodtyroninu jsme pozorovali posun maxima až na 6 hodin po aplikaci a hodnoty obou trijodtyroninů byly nižší (tT_3 33-násobek a fT_3 47-násobek oproti kontrolní skupině potkanů). Příčinou nižší hladiny trijodtyroninu po opakovaných aplikacích hormonu je pravděpodobně jeho degradace. Ta spočívá v úplné dejodaci trijodtyroninu a v inaktivaci deaminací a dekarboxylací. Poté jaterní glukuronidace a sulfatace dává vznik hydrofilnějším molekulám, které se vylučují do žluče, reabsorbují ve střevě a vylučují močí jako konjugáty s kyselinou glukuronovou (Kelly, 2000). V séru tedy dochází k rychlé degradaci hormonu, ačkoliv účinek trijodtyroninu na expresi mGPDH a UCP2 nevymizel. To je dáno pravděpodobně prodlevou, během níž dochází k vazbě hormonu a specifického receptoru, následně vazbě vzniklého komplexu na specifickou oblast DNA a aktivaci

transkripce mRNA (Rabelo et al., 1996). Ta má za následek zvýšení mGPDH a UCP2 transkriptu.

V poslední fázi naší studie jsme zkoumali změnu exprese mRNA UCP2 po parciální 2/3 hepatektomii v různých časových intervalech. Při parciální hepatektomii u potkanů je poměr maximální DNA syntézy v hepatocytech 24 hodin po operaci a počáteční velikost orgánu je obnovena po 7 až 10 dnech (Červinková et al., 1998). Proliferace hepatocytů po parciální hepatektomii začíná přechodem zralých, plně diferencovaných hepatocytů z klidového G_0 stavu do prereplikativní G_1 fáze buněčného cyklu, což trvá 12 až 24 hodin. Po této fázi následuje DNA syntéza, která vrcholí 22 až 24 hodin po hepatektomii, a mitóza o dalších 6 až 8 hodin později. Během prereplikativní fáze jaterní regenerace je mitochondriální funkce a struktura jater změněná (Moro et al., 2004).

Expres genů při regeneraci jater se může rozdělit do několika fází, během prvních 4 hodin dochází k expresi bezprostředních časných genů jako c-fos, c-jun atd., dochází také k aktivaci JNK kináz, TNF. Během této fáze klidové hepatocyty vstupují do buněčného cyklu, resp. do G_1 fáze, která je u potkanů kratší než u myší. Mezi 4 a 8 hodinou následuje exprese tzv. zpožděných genů (bclx), mezi 8 a 20 hodinou exprese genů buněčného cyklu (p53, p21, mdm2) a od 20 hodiny po parciální hepatektomii dochází k expresi genů důležitých pro DNA replikaci a mitózu (cyclin D1, cyclin E, C, B, ras) (Fausto, 2000).

Při našich pokusech jsme zjistili, že již 3 hodiny po provedení parciální hepatektomie dochází k maximální (téměř 5-násobné) indukci UCP2 transkriptu, což znamená, že UCP2 gen se bude řadit spíše mezi bezprostřední časné geny. Během dalších 9 hodin docházelo k mírnému poklesu UCP2 transkriptu až na 3-násobek hladiny mRNA UCP2 u kontrolních potkanů. Poté jsme však pozorovali během následujících 12 hodin výraznější pokles na 1,59-násobek oproti kontrole. Podobné pokusy prováděli také Lee a spol. (1999 B), kteří u kontrolních myší pozorovali stejně jako my u potkanů nízké hladiny mRNA UCP2. Po více než třech hodinách po hepatektomii pozorovali vzestup hladiny mRNA UCP2 až na téměř 3-násobek původní hodnoty 6 hodin po operaci. Poté sledovali pokles, kdy ve 12 hodině byla exprese UCP2 přibližně 2,5-násobná a ve 24. hodině více než 2-násobná. Během dalších 12 hodin došlo k poklesu UCP2 transkriptu téměř až na původní hodnoty, aby poté opět stoupala na více než 2-násobek mezi 48 až 96 hodinou po parciální hepatektomii. Lee a spol. tedy prokázali, že parciální hepatektomie způsobuje přechodnou bifazickou indukci

exprese UCP2. Počáteční velmi výrazná indukce UCP2 transkriptu začíná krátce po časném zvýšení produkce mitochondriálních oxidantů v játrech a shoduje se s poklesem tvorby oxidantů. Poté, 36 hodin po parciální hepatektomii, se exprese snižuje téměř až na bazální hodnoty. Rozdíl mezi maximem exprese UCP2 v našich pokusech (3. hodina) a pokusech, které provedli Lee a spol. (6. hodina), může být způsoben právě rozdílnou dobou G₁ fáze, která je u myši delší. Lee a spol. (1999 B) ve své studii také zjistili, že produkce oxidantů a exprese UCP2 jsou signifikantně inhibovány injekcí protilátek proti TNF myším před parciální hepatektomií. UCP2 je mitochondriálním membránovým proteinem, který snižuje produkci oxidantů. V regenerujících játrech se vyskytuje zvýšená produkce ROS díky TNF, která je během několika hodin blokována díky UCP2 (Lee et al., 1999 B). UCP2 je proto důležitý pro udržení rovnováhy mezi syntézou ATP potřebnou při regeneraci jater a množstvím vznikajících reaktivních kyslíkových radikálů, neboť v případě nedostatku UCP2 dochází ke snížení buněčné proliferace a ke zpomalení až zastavení regenerace jater (Wu et al., 2009). Indukce exprese UCP2 je v hepatocytech potřebná zejména v podmínkách jejich dediferenciace.

6. Závěr

Hormony štítné žlázy, zejména trijodtyronin zvyšuje mitochondriální respiraci a podporuje odpřažení oxidační fosforylace v mitochondriích. Efekt trijodtyroninu se uskutečňuje přímo nebo prostřednictvím ovlivnění transkripce genů kódujících mitochondriální proteiny.

Dřívější studie ukazovaly možnost indukce exprese UCP2 pomocí trijodtyroninu, ale žádná z nich se nezabývala kinetikou této exprese. Proto jsme se rozhodli zjistit změny exprese mRNA UCP2 zejména v časných intervalech po aplikaci hormonu. V našich pokusech jsme nejprve sledovali indukci mitochondriální glycerofosfátdehydrogenázy (mGPDH) pomocí trijodtyroninu. Aktivace mGPDH v játrech pomocí tyroidních hormonů představuje užitečný modelový systém pro studium mechanismu zapojeného v hormonální regulaci biogeneze mitochondriálních enzymů a proteinů. Sledovali jsme aktivitu mGPDH, množství tohoto proteinu a mRNA během prvních 72 hodin po aplikaci jedné nebo tří dávek trijodtyroninu. Na základě výsledků tohoto modelového systému jsme poté vytvořili schéma experimentálních podmínek pro sledování kinetiky exprese mRNA UCP2 po indukci pomocí trijodtyroninu.

Pro zjištění exprese RNA UCP2 jsme úspěšně zavedli metodu reverzní transkripce a následné real-time polymerázové řetězové reakce s nově navrženými primery a hydrolytickou sondou. Tato metoda nám umožnila dobře sledovat změny exprese UCP2 v prvních 24 hodinách po aplikaci jedné nebo tří dávek trijodtyroninu. Zjistili jsme, že po aplikaci jedné dávky dochází k téměř dvojnásobnému zvýšení mRNA UCP2, ale po aplikaci tří dávek hormonu jsme indukci exprese UCP2 nepozorovali. Ve stejných časových intervalech jsme rovněž stanovovali koncentrace volného a celkového trijodtyroninu v séru. Po aplikaci jedné dávky hormonu jsme pozorovali výraznější změny koncentrace volného i celkového trijodtyroninu oproti výsledkům po podání tří dávek. Získané výsledky naznačují, že vysoké koncentrace hormonu v séru jsou nezbytné pro možnost stimulace genové exprese UCP2 u potkanů.

V další části práce jsme ověřovali expresi mRNA UCP2 v jaterní tkáni potkana po parciální (2/3) hepatektomii v časových intervalech 1, 3, 6, 12 a 24 hodin. U potkanů po provedení hepatektomie jsme pozorovali již po 3 hodinách téměř 4-násobné zvýšení exprese RNA UCP2, které bylo výraznější než po aplikaci trijodtyroninu.

Závěrem lze říci, že zvýšení mRNA UCP2 v jaterní tkáni může být vysvětleno zvýšením energetické spotřeby a metabolismu, které jsou indukovány a regulovány tyroidními hormony prostřednictvím odprážení oxidační fosforylace. Zvýšený metabolismus a spotřeba energie vedou ke zvýšení produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které mohou být signálem pro up-regulaci RNA UCP2 a proteinu v hepatocytech. Parciální hepatektomie je proliferační děj, který spotřebovává značné množství energie, ale na druhou stranu je provázen zvýšenou tvorbou ROS. Rovněž trijodtyronin zvyšuje mitochondriální produkci kyslíkových radikálů. To podporuje předpoklad, že indukce UCP2 v játrech je fyziologickým antioxidačním ochranným mechanismem proti zvýšené produkci ROS.

7. Literatura

1. AFFOURTIT, C.; BRAND, M.D. On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008, vol. 1777, s. 973-979.
2. ALÁN, L.; SMOLKOVÁ, K.; KRONUSOVÁ, E.; ŠANTOROVÁ, J.; JEŽEK, P. Absolute levels of transcripts for mitochondrial uncoupling proteins UCP2, UCP3, UCP4, and UCP5 show different patterns in rat and mice tissues. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2009, vol. 41, s. 71-78.
3. ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie.* Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998. Kapitola 13: Získávání energie v mitochondriích a chloroplastech, s. 407-446. ISBN 80-902906-0-4.
4. ANDERLOVÁ, K.; DOLEŽALOVÁ, R.; HALUZÍK, M. PPAR- α a inzulinová senzitivita. *DMEV.* 2006, vol. 1, s. 15-18.
5. APRILETTI, J.W.; RIBEIRO, R.C.; WAGNER, R.L.; FENG, W.; WEBB, P.; KUSHNER, P.J.; WEST, B.L.; NILSSON, S.; SCANLAN, T.S.; FLETTERICK, R.J.; BAXTER, J.D. Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* 1998, vol. 25, s. 2-11.
6. ARGYROPOULOS, G.; HARPER, M.E. Uncoupling proteins and thermoregulation. *J. Appl. Physiol.* 2002, vol. 92, s. 2187-2198.
7. BAFFY, G. Uncoupling protein-2 and non-alcoholic fatty liver disease. *Front. Biosci.* 2005, vol. 10, s. 2082-2096.
8. BAFFY, G. Uncoupling protein-2 and cancer. *Mitochondrion.* 2010, vol. 10, s. 243-252.
9. BARAZZONI, R.; NAIR, K.S. Changes in uncoupling protein-2 and-3 expression in aging rat skeletal muscle, liver, and heart. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001, vol. 280, s. E413-E419.
10. BARBE, P.; LARROUY, D.; BOULANGER, C.; CHEVILLOTTE, E.; VIGUERIE, N.; THALAMAS, C.; TRASTOY, M.O.; ROQUES, M.; VIDAL, H.; LANGIN, D. Triiodothyronine-mediated up-regulation of UCP2 and UCP3 mRNA expression in human skeletal muscle without coordinated induction of mitochondrial respiratory chain genes. *FASEB J.* 2001, vol. 15, no. 1, s. 13-15.

11. BARNOVÁ, E.; ČÁRSKÝ, J.; DUCHOŇ, J.; LEDVINA, M. *Lékařská chemie a biochemie*. Avicenum, Osveta, 1990.
12. BEREITER-HAHN, J. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* 1990, vol. 122, s. 1-63.
13. BLANC, J.; ALVES-GUERRA, M.C.; ESPOSITO, B.; ROUSSET, S.; GOURDY, P.; RICQUIER, D.; TEDQUI, A.; MIROUX, B.; MALLAT, Z. Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis. *Circulation*. 2003, vol. 107, no. 3, s. 388-390.
14. BORECKÝ, J.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P. Mitochondrial Uncoupling Proteins in Mammals and Plants. *Biosci. Rep.* 2001, vol. 21, no. 2, s. 201-212.
15. BOSS, O.; HAGEN, T.; LOWELL, B.B. Uncoupling Proteins 2 and 3 Potential Regulators of Mitochondrial Energy Metabolism. *Diabetes*. 2000, vol. 49, s. 143-156.
16. BOSS, O.; SAMEC, S.; DULLOO, A.; SEYDOUX, J.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J.P. Tissue-dependent upregulation of rat uncoupling protein-2 expression in response to fasting or cold. *FEBS Lett.* 1997 A, vol. 412, no. 1, s. 111-114.
17. BOSS, O.; SAMEC, S.; PAOLONI-GIACOBINO, A.; ROSSIER, C.; DULLOO, A.; SEYDOUX, J.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J.P. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 1997 B, vol. 408, no. 1, s. 39-42.
18. BOUCHARD, C.; PÉRUSSE, L.; CHAGNON, Y.C.; WARDEN, C.; RICQUIER, D. Linkage between markers in the vicinity of the uncoupling protein 2 gene and resting metabolic rate in humans. *Hum. Mol. Genet.* 1997, vol. 6, no. 11, s. 1887-1889.
19. BOUILLAUD, F.; COUPLAN, E.; PECQUEUR, C.; RICQUIER, D. Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001, vol. 1504, s. 107-119.
20. BRAND, M.D.; ESTEVES, T.C. Physiological functions of the mitochondrial proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metabolism*. 2005, vol. 2, s. 85- 93.
21. BRAUNER, P.; FLACHS, P.; KOPECKÝ, J. Odpráhující proteiny a metabolický syndrom. *Postgrad. Med.* 2002, vol. 4, s. 404-409.

22. BROWN, L.J.; MACDONALD, M.J.; LEHN, D.A.; MORAN, S.M. Sequence of rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase cDNA. *J. Biol. Chem.* 1994, vol. 269, s. 14363-14366.
23. CAMIRAND, A.; MARIE, V.; RABELO, R.; SILVA, J.E. Thiazolidinediones Stimulate Uncoupling Protein-2 Expression in Cell Lines Representing White and Brown Adipose Tissues and Skeletal Muscle. *Endocrinology.* 1998, vol. 139, no. 1, s. 428-431.
24. CANNON, B.; SHABALINA, I.G.; KRAMAROVA, T.V.; PETROVIC, N.; NEDERGAARD, J. Uncoupling proteins: A role in protection against reactive oxygen species—or not? *Biochim. Biophys. Acta.* 2006, vol. 1757, s. 449-458.
25. CARMONA, M.C.; VALMASEDA, A.; BRUN, S.; VIÑAS, O.; MAMPEL, T.; IGLESIAS, R.; GIRALT, M.; VILLARROYA, F. Differential Regulation of Uncoupling Protein-2 and Uncoupling Protein-3 Gene Expression in Brown Adipose Tissue during Development and Cold Exposure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, vol. 243, no. 1, s. 224-228.
26. CARRETERO, M.V.; TORRES, L.; LATASA, M.U.; GARCÍA-TREVIJANO, E.R.; PRIETO, J.; MATO, J.M.; AVILA, M.A. Transformed but not normal hepatocytes express UCP2. *FEBS Lett.* 1998, vol. 439, s. 55-58.
27. CASANOVA, J.; HOROWITZ, Z.D.; COPP, R.P.; MCINTYRE, W.R.; PASCUAL, A.; SAMUELS, H.H. Photoaffinity labeling of thyroid hormone nuclear receptors. Influence of n-butyrate and analysis of the half-lives of the 57,000 and 47,000 molecular weight receptor forms. *J. Biol. Chem.* 1984, vol. 259, no. 19, s. 12084-12091.
28. CLAY, V.J.; RAGAN, C.I. Biosynthesis and import into the mitochondrion of l-3-glycerophosphate dehydrogenase, and the effect of thyroid hormone deficiency on gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1989, vol. 975, s. 112-118.
29. COOK, C.B.; KAKUCSKA, I.; LECHAN, R.M.; KOENIG, R.J. Expression of thyroid hormone receptor β_2 in rat hypothalamus. *Endocrinology.* 1992, vol. 130, s. 1077-1079.
30. CORTEZ-PINTO, H.; LIN, H.Z.; YANG, S.Q.; DA COSTA, S.O.; DIEHL, A.M. Lipids Up-regulate Uncoupling Protein 2 Expression in Rat Hepatocytes. *Gastroenterology.* 1999, vol. 116, s. 1184-1193.

31. CORTEZ-PINTO, H.; YANG, S.Q.; LIN, H.Z.; COSTA, S.; HWANG, C.S.; LANE, M.D.; BAGDY, G.; DIEHL, A.M. Bacterial Lipopolysaccharide Induces Uncoupling Protein-2 Expression in Hepatocytes by a Tumor Necrosis Factor- α -Dependent Mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, vol. 251, no. 1, s. 313-319.
32. COSTANTINO, P.; ATTARDI, G. Identification of discrete electrophoretic components among the products of mitochondrial protein synthesis in HeLa cells. *J. Mol. Biol.* 1975, vol. 96, s. 291–306.
33. COULIBALY, I.; GAHR, S.A.; PALTI, Y.; YAO, J.; REXROAD, C.E. III. Genomic structure and expression of uncoupling protein 2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics.* 2006, vol. 7, s. 203.
34. CUSIN, I.; ZAKRZEWSKA, K.E.; BOSS, O.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J.P.; RICQUIER, D.; JEANRENAUD, B.; ROHNER-JEANRENAUD, F. Chronic Central Leptin Infusion Enhances Insulin-Stimulated Glucose Metabolism and Favors the Expression of Uncoupling Proteins. *Diabetes.* 1998, vol. 47, no. 7, s. 1014-1019.
35. ČERVINKOVÁ, Z.; LOTKOVÁ, H.; KŘIVÁKOVÁ, P.; ROUŠAR, T.; KUČERA, O.; TICHÝ, L.; ČERVINKA, M.; DRAHOTA, Z. Evaluation of Mitochondrial Function in Isolated Rat Hepatocytes and Mitochondria during Oxidative Stress. *ATLA.* 2007, vol. 35, s. 353-361.
36. ČERVINKOVÁ, Z.; SVÁTKOVÁ, R.; KALOUS, M.; RAUCHOVÁ, H.; ČERVINKA, M.; DRAHOTA, Z. Effect of Triiodothyronine Administration on the Recovery of Liver Oxidative Capacity after Partial Hepatectomy. *Eur. Surg. Res.* 1998, vol. 30, s. 371-377.
37. DHEDA, K.; HUGGETT, J.F.; BUSTIN, S.A.; JOHNSON, M.A.; ROOK, G.; ZUMLA, A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques.* 2004, vol. 37, no. 1, s. 112-114, 116, 118-119.
38. DÜMMLER, K.; MÜLLER, S.; SEITZ, H.J. Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues. *Biochem. J.* 1996, vol. 317, s. 913-918.
39. ECHTAY, K.S. Mitochondrial uncoupling proteins—What is their physiological role? *Free Radic. Biol. Med.* 2007, vol. 43, s. 1351-1371.

40. ECHTAY, K.S.; MURPHY, M.P.; SMITH, R.A.J.; TALBOT, D.A.; BRAND, M.D. Superoxide Activates Mitochondrial Uncoupling Protein 2 from the Matrix Side. *J. Biol. Chem.* 2002, vol. 277, no. 49, s. 47129-47135.
41. EMRE, Y.; NÜBEL, T. Uncoupling protein UCP2: When mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Lett.* 2010, vol. 584, s. 1437-1442.
42. ENERBÄCK, S.; JACOBSSON, A.; SIMPSON, E.M.; GUERRA, C.; YAMASHITA, H.; HARPER, M.E.; KOZAK, L.P. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature.* 1997, vol. 387, no. 6628, s. 90-94.
43. ERLANSON-ALBERTSSON, C. Uncoupling proteins - a new family of proteins with unknown function. *Nutr. Neurosci.* 2002, vol. 5, s. 1-11.
44. ESTERBAUER, H.; SCHNEITLER, C.; OBERKOFER, H.; EBENBICHLER, C.; PAULWEBER, B.; SANDHOFER, F.; LADURNER, G.; HELL, E.; STROBERG, A.D.; PATSCH, J.R.; KREMPLER, F.; PATSCH, W. A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nat. Genet.* 2001, vol. 28, no. 2, s. 178-83.
45. EVANS, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988, vol. 240, s. 889-895.
46. FAGGIONI, R.; SHIGENAGA, J.; MOSER, A.; FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Induction of UCP2 Gene Expression by LPS: A Potential Mechanism for Increased Thermogenesis during Infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, vol. 244, s. 75-78.
47. FAUSTO, N. Liver regeneration. *J. Hepatol.* 2000, vol. 32, suppl. 1, s. 19-31.
48. FAUSTO, N.; RIEHLE, K.J. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 2005, vol. 12, no. 3, s. 181-189.
49. FILIPČÍK, P.; ŠTRBÁK, V.; BRŤKO, J. Thyroid hormone receptor occupancy and biological effects of 3,5,3-L-triiodothyronine (T₃) in GH₄C₁ rat pituitary tumor cells. *Physiol. Res.* 1998, vol. 47, s. 41-46.
50. FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPIGNY, O.; LEVI-MEYRUEIS, C.; BOUILLAUD, F.; SELDIN, M.F.; SURWIT, R.S.; RICQUIER, D.; WARDEN, C.H. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* 1997, vol. 15, no. 3, s. 269-272.

51. FLEURY, C.; SANCHIS, D. The mitochondrial uncoupling protein-2: current status. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999, vol. 31, s. 1261-1278.
52. GANONG, W.F. *Přehled lékařské fyziologie*. Jinočany: H&H, 1995.
53. GAO, L.; LAUDE, K.; CAI, H. Mitochondrial Pathophysiology, Reactive Oxygen Species, and Cardiovascular Diseases. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2008, vol. 38, no. 1, s. 137-155.
54. GARLID, K.D.; JABŮREK, M.; JEŽEK, P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 1998, vol. 438, s. 10-14.
55. GARRIB, A.; MCMURRAY, W.C. Cell-free synthesis of a putative precursor to the rat liver mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 1988, vol. 263, s. 19821-19826.
56. GIMENO, R.E.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; SHYJAN, A.W.; GIMENO, C.J.; IRIS, F.; ELLIS, S.J.; WOOLF, E.A.; TARTAGLIA, L.A. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes.* 1997, vol. 46, no. 5, s. 900-906.
57. GLASS, C.K.; HOLLOWAY, J.M. Regulation of gene expression by thyroid hormone receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990, vol. 1032, s. 157-176.
58. GNANALINGHAM, M.G.; MOSTYN, A.; GARDNER, D.S.; STEPHENSON, T.; SYMONDS, M.E. Developmental regulation of the lung in preparation for life after birth: hormonal and nutritional manipulation of local glucocorticoid action and uncoupling protein-2. *J. Endocrinol.* 2006, vol. 188, s. 375-386.
59. GOGLIA, F.; MORENO, M.; LANNI, A. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett.* 1999, vol. 452, s. 115-120.
60. GRISOLIA, S.; HERNANDEZ-YAGO, J.; KNECHT, E. Regulation of mitochondrial protein concentration: a plausible model which may permit assessing protein turnover. *Curr. Top. Cell. Regul.* 1985, vol. 27, s. 387– 396.
61. HARE, J.F. Mechanisms of membrane protein turnover. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990, vol. 1031, s. 71– 90.
62. HARE, J.F.; HODGES, R. Turnover of mitochondrial matrix polypeptides in hepatoma monolayer cultures. *J. Biol. Chem.* 1982, vol. 257, s. 12950– 12953.
63. HARPER, M.E.; BRAND, M.D. The quantitative contributions of mitochondrial proton leak and ATP turnover reactions to the changed respiration rates of

- hepatocytes from rats of different thyroid status. *J. Biol. Chem.* 1993, vol. 268, s. 14850-14860.
64. HEATON, G.M.; WAGENVOORD, R.J.; KEMP, A.; NICHOLLS, D.G. Brown-Adipose-Tissue Mitochondria: Photoaffinity Labelling of the Regulatory Site of Energy Dissipation. *Eur. J. Biochem.* 1978, vol. 82, s. 515-521.
 65. HIGGINS, G.M.; ANDERSON, R.M. Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 1931, vol. 12, s. 186-202.
 66. HODIN, R.A.; LAZAR, M.A.; WINTMAN, B.I.; DARLING, D.S.; KOENIG, R.J.; LARSEN, P.R.; MOORE, D.D.; CHIN W.W. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science.* 1989, vol. 244, s. 76-79.
 67. HODNÝ, Z.; KOLÁŘOVÁ, P.; ROSSMEISL, M.; HORÁKOVÁ, M.; NIBBELINK, M.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L.; KOPECKÝ, J. High expression of uncoupling protein 2 in foetal liver. *FEBS Lett.* 1998, vol. 425, s. 185-190.
 68. HORIMOTO, M.; FÜLÖP, P.; DERDÁK, Z.; WANDS, J.R.; BAFFY, G. Uncoupling Protein-2 Deficiency Promotes Oxidant Stress and Delays Liver Regeneration in Mice. *Hepatology.* 2004, vol. 39, s. 386-392.
 69. HORTON, J.D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 2002, vol. 109, no. 9, s. 1125-1131.
 70. HORVATH, T.L.; DIANO, S.; BARNSTABLE, C. Mitochondrial uncoupling protein 2 in the central nervous system: neuromodulator and neuroprotector. *Biochem. Pharmacol.* 2003, vol. 65, s. 1917-1921.
 71. HOUSTEK, J.; CANNON, B.; LINDBERG, O. Glycerol-3-phosphate shuttle and its function in intermediary metabolism of hamster brown adipose tissue. *Eur. J. Biochem.* 1975, vol. 54, s. 11-18.
 72. HOUŠTĚK, J. Genetické aspekty mitochondriálních chorob. *Lék. Listy.* 2001, vol. 50, s. 22-25.
 73. http://open.jorum.ac.uk/xmlui/bitstream/handle/123456789/956/Items/S377_1_section7.html.
 74. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/WoodC/western.html>.

75. <http://www.komabiotech.co.kr/www/techniques/proteinSandT/transferSystem.gif>.
76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=10116&chr=1>.
77. HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005, vol. 6, no. 4, s. 279-284.
78. HUN, C.S.; HASEGAWA, K.; KAWABATA, T.; KATO, M.; SHIMOKAWA, T.; KAGAWA, Y. Increased Uncoupling Protein2 mRNA in White Adipose Tissue, and Decrease in Leptin, Visceral Fat, Blood Glucose, and Cholesterol in KK-A^y Mice Fed with Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in Addition to Linolenic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, vol. 259, no. 1, s. 85-90.
79. HURTAUD, C.; GELLY, C.; BOUILLAUD, F.; LÉVI-MEYRUEIS, C. Translation control of UCP2 synthesis by the upstream open reading frame. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006, vol. 63, s. 1780-1789.
80. HWANG, S.; BENJAMIN, L.E.; OH, B.; ROTHSTEIN, J.L.; ACKERMAN, S.L.; BEDDINGTON, R.S.; SOLTER, D.; KNOWLES, B.B. Genetic mapping and embryonic expression of a novel, maternally transcribed gene Mem3. *Mamm. Genome.* 1996, vol. 7, no. 8, s. 586-590.
81. CHAN, C.B.; DE LEO, D.; JOSEPH, J.W.; MCQUAID, T.S.; HA, X.F.; XU, F.; TSUSHIMA, R.G.; PENNEFATHER, P.S.; SALAPATEK, A.M.F., WHEELER, M.B. Increased Uncoupling Protein-2 Levels in β -cells Are Associated With Impaired Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes.* 2001, vol. 50, s. 1302-1310.
82. CHAN, C.B.; KASHEMSANT, N. Regulation of insulin secretion by uncoupling protein. *Biochem. Soc. Trans.* 2006, vol. 34, no. 5, s. 802-805.
83. CHAN, C.B.; SALEH, M.C.; KOSHKIN, V.; WHEELER, M.B. Uncoupling Protein 2 and Islet Function. *Diabetes.* 2004, vol. 53, suppl. 1, s. S136-S142.
84. CHEVILLOTTE, E.; RIEUSSET, J.; ROQUES, M.; DESAGE, M.; VIDAL, H. The Regulation of Uncoupling Protein-2 Gene Expression by ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids in Human Skeletal Muscle Cells Involves Multiple Pathways, Including the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-activated Receptor β . *J. Biol. Chem.* 2001, vol. 276, no. 14, s. 10853-10860.

85. CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, vol. 162, no. 1, s. 156-159.
86. CHOWDHURY, S.K.; DRAHOTA, Z.; FLORYK, D.; CALDA, P.; HOUSTEK, J. Activities of mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes in cultured aminocytes. *Clin. Chim. Acta.* 2000, vol. 298, s. 157-173.
87. ICHIKAWA, K.; BRTKO, J.; DEGROOT, L.J.; HASHIZUME, K.; YAMADA, T. Stabilization, accurate determination, and purification of rat liver nuclear thyroid hormone receptor. *J. Endocrinol.* 1989, vol. 120, s. 237-243.
88. ICHIKAWA, K.; HASHIZUME, K. Thyroid hormone action in the cell. *Endocr. J.* 1995, vol. 42, s. 131-140.
89. JABŮREK, M.; VAŘECHA, M.; GIMENO, R.E.; DEMBSKI, M.; JEŽEK, P.; ZHANG, M.; BURN, P.; TARTAGLIA, L.A.; GARLID, K.D. Transport Function and Regulation of Mitochondrial Uncoupling Proteins 2 and 3. *J. Biol. Chem.* 1999, vol. 274, no. 37, s. 26003-26007.
90. JEŽEK, P. Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins—UCPn. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002, vol. 34, s. 1190-1206.
91. JEŽEK, P.; JEŽEK, J. Sequence anatomy of mitochondrial anion carriers. *FEBS Lett.* 2003, vol. 534, s. 15-25.
92. JEŽEK, P.; URBÁNKOVÁ, E. Specific Sequence Motifs of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *IUBMB Life.* 2000, vol. 49, s. 63-70.
93. JEŽEK, P.; ŽÁČKOVÁ, M.; RŮŽIČKA, M.; ŠKOBISOVÁ, E.; JABŮREK, M. Mitochondrial Uncoupling proteins – Facts and Fantasies. *Physiol. Res.* 2004, vol. 53, suppl. 1, s. S199-S211.
94. JIA, J.J.; ZHANG, X.; GE, C.R.; JOIS, M. The polymorphisms of UCP2 and UCP3 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Obes. Rev.* 2009, vol. 10, no. 5, s. 519-526.
95. KADENBACH, B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003, vol. 1604, no., 2, s. 77-94.
96. KALDERON, B.; HERTZ, R.; BARTANA, J. Effect of thyroid-hormone treatment on redox and phosphate potentials in rat-liver. *Endocrinology.* 1992, vol. 131, s. 400-407.

97. KASER, M.; LANGER, T. Protein degradation in mitochondria. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2000, vol. 11, s. 181–190.
98. KELLY, G. Peripheral Metabolism of Thyroid Hormones: A Review. *Altern. Med. Rev.* 2000, vol. 5, no. 4, s. 306-333.
99. KIMURA, K.; JUNG, B.D.; KANEHIRA, K.; IRIE, Y.; CAÑAS, X.; SAITO, M. Induction of uncoupling protein (UCP) 2 in primary cultured hepatocytes. *FEBS Lett.* 1999, vol. 457, s. 75-79.
100. KLINGENBERG, M. Uncoupling Protein – A Useful Energy Dissipator. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999, vol. 31, no. 5, s. 419-430.
101. KLINGENBERG, M.; ECHTAY, K.S. Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001, vol. 1504, s. 128-143.
102. KOZA, R.A.; KOZAK, U.C.; BROWN, L.J.; LEITER, E.H.; MACDONALD, M.J.; KOZAK, L.P. Sequence and tissue-dependent RNA expression of mouse FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996, vol. 336, s. 97-104.
103. KRAUSS, S.; ZHANG, C.Y.; LOWELL, B.B. A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, vol. 99, no. 1, s. 118-122.
104. KRAUSS, S.; ZHANG, C.Y.; LOWELL, B.B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, vol. 6, no. 3, s. 248-261.
105. KŘEMEN, J.; POHLREICH, P.; STŘÍBRNÁ, J. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně.* Praha: Karolinum, 1998. 8. Syntéza cDNA a její klonování v bakteriálních buňkách, s. 40, 60-61, 80-83.
106. KUAI, X.Y.; JI, Z.Y.; ZHANG, H.J. Mitochondrial uncoupling protein 2 expression in colon cancer and its clinical significance. *World J. Gastroenterol.* 2010, vol. 16, no. 45, s. 5773-5778.
107. KUMAR, R.; THOMPSON, E.B. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids.* 1999, vol. 64, s. 310-319.
108. LALOI, M.; KLEIN, M.; RIESMEIER, J.W.; MÜLLER-RÖBER, B.; FLEURY, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature.* 1997, vol. 389, no. 6647, s. 135-136.
109. LAMELOISE, N.; MUZZIN, P.; PRENTKI, M.; ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F. Uncoupling Protein 2: A Possible Link Between Fatty Acid Excess

- and Impaired Glucose-Induced Insulin Secretion? *Diabetes*. 2001, vol. 50, s. 803-809.
110. LANNI, A.; CIMMINO, M.; MORENO, M.; DELLI GATTI, A.; GINESTRA, A.; GOGLIA, F. Relationship between dose, mode of administration and effects of triiodothyronine on two hepatic responsive enzymes. *Horm. Metab. Res.* 1995, vol. 27, s. 314-317.
111. LANNI, A.; DE FELICE, M.; LOMBARDI, A.; MORENO, M.; FLEURY, C.; RICQUIER, D.; GOGLIA, F. Induction of UCP₂ mRNA by thyroid hormones in rat heart. *FEBS Lett.* 1997, vol. 418, s. 171-174.
112. LANNI, A.; MORENO, M.; LOMBARDI, A.; GOGLIA, F. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 2003, vol. 543, s. 5-10.
113. LARROUY, D.; LAHARRAGUE, P.; CARRERA, G.; VIGUERIE-BASCANDS, N.; LEVI-MEYRUEIS, C.; FLEURY, C.; PECQUEUR, C.; NIBBELINK, M.; ANDRÉ, M.; CASTEILLA, L.; RICQUIER, D. Kupffer Cells Are a Dominant Site of Uncoupling Protein 2 Expression in Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, vol. 235, s. 760-764.
114. LAZAR, M.A. Thyroid hormone receptors: Multiple forms, multiple possibilities. *Endocr. Rev.* 1993, vol. 14, s. 184-193.
115. LEDESMA, A.; DE LACOPA, M.G. The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol.* 2002, vol. 3, no. 12, 3015.1-3015.9.
116. LEE, F.Y.J.; LI, Y.; YANG, E.K.; YANG, S.Q.; LIN, H.Z.; TRUSH, M.A.; DANNENBERG, A.J.; DIEHL, A.M. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient, obese mice. *Am. J. Physiol.* 1999 A, vol. 276, no. 2, s. C386-394.
117. LEE, F.Y.J.; LI, Y.; ZHU, H.; YANG, S.; LIN, H.Z.; TRUSH, M.; DIEHL, A.M. Tumor Necrosis Factor Increases Mitochondrial Oxidant Production and Induces Expression of Uncoupling Protein-2 in the Regenerating Rat Liver. *Hepatology*. 1999 B, vol. 29, s. 677-687.
118. LEONARD, J.V.; SCHAPIRA, H.V. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet*. 2000, vol. 355, s. 299-304.
119. LI, M.D. Leptin and Beyond: An Odyssey to the Central Control of Body Weight. *Yale J. Biol. Med.* 2011, vol. 84, no. 1, s. 1-7.

120. LIPSKY, N.G.; PEDERSEN, P.L. Mitochondrial turnover in animal cells. Half-lives of mitochondria and mitochondrial subfractions of rat liver based on [¹⁴C]bicarbonate incorporation. *J. Biol. Chem.* 1981, vol. 256, s. 8652– 8657.
121. LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods.* 2001, vol. 25, no. 4, s. 402-408.
122. LOWELL, B.B.; BACHMAN, E.S. Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J. Biol. Chem.* 2003, vol. 278, no. 32, s. 29385-29388.
123. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, vol. 193, s. 265-275.
124. MACDONALD, M.J.; BROWN, L.J. Calcium activation of mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase restudied. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996, vol. 326, s. 79-84.
125. MAO, W.; YU, X.X.; ZHONG, A.; LI, W.; BRUSH, J.; SHERWOOD, S.W.; ADAMS, S.H.; PAN, G. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett.* 1999, vol. 443, no. 3, s. 326-330.
126. MASAKI, T.; YOSHIMATSU, H.; KAKUMA, T.; HIDAKA, S.; KUROKAWA, M.; SAKATA, T. Enhanced expression of uncoupling protein 2 gene in rat white adipose tissue and skeletal muscle following chronic treatment with thyroid hormone. *FEBS Lett.* 1997, vol. 419, s. 323-326.
127. MATER, M.K.; THELEN, A.P.; PAN, D.A.; JUMP, D.B. Sterol Response Element-binding Protein 1c (SREBP1c) Is Involved in the Polyunsaturated Fatty Acid Suppression of Hepatic S14 Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* 1999, vol. 274, no. 46, s. 32725-32732.
128. MATSUDA, J.; HOSODA, K.; ITOH, H.; SON, C.; DOI, K.; TANAKA, T.; FUKUNAGA, Y.; INOUE, G.; NISHIMURA, H.; YOSHIMASA, Y.; YAMORI, Y.; NAKAO, K. Cloning of rat uncoupling protein-3 and uncoupling protein-2 cDNAs: their gene expression in rats fed high-fat diet. *FEBS Lett.* 1997, vol. 418, s. 200-204.

129. MATTIASSON, G.; SHAMLOO, M.; GIDO, G.; MATHI, K.; TOMASEVIC, G.; YI, S.; WARDEN, C.H.; CASTILHO, R.F.; MELCHER, T.; GONZALES-ZULUETA, M.; NIKOLICH, K.; WIELOCH, T. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat. Med.* 2003, vol. 9, no. 8, s. 1062-1068.
130. MATTIASSON, G.; SULLIVAN, P.G. The Emerging Functions of UCP in Health, Disease, and Therapeutics. *Antioxid. Redox Signal.* 2006, vol. 8, s. 1-38.
131. MATTSON, M.P.; LIU, D. Mitochondrial potassium channels and uncoupling proteins in synaptic plasticity and neuronal cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, vol. 304, s. 539-549.
132. MEHTA, S.L.; LI, P.A. Neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cerebral stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2009, vol. 29, s. 1069-1078.
133. MIKULOVÁ, R.; HAINER, V. Uncoupling proteiny. *Čas. Lék. Čes.* 2001, vol. 140, no. 13, s. 387-391.
134. MILLET, L.; VIDAL, H.; ANDREELLI, F.; LARROUY, D.; RIOU, J.P.; RICQUIER, D.; LAVILLE, M.; LANGIN, D. Increased Uncoupling Protein-2 and -3 mRNA Expression during Fasting in Obese and Lean Humans. *J. Clin. Invest.* 1997, vol. 100, s. 2665-2670.
135. MORO, L.; MARRA, E.; CAPUANO, F.; GRECO, M. Thyroid Hormone Treatment of Hypothyroid Rats Restores the Regenerative Capacity and the Mitochondrial Membrane Permeability Properties of the Liver after Partial Hepatectomy. *Endocrinology.* 2004, vol. 145, no. 11, s. 5121 – 5128.
136. MOSTYN, A.; LITTEN, J.C.; PERKINS, K.S.; EUDEN, P.J.; CORSON, A.M.; SYMONDS, M.E.; CLARKE, L. Influence of size at birth on the endocrine profiles and expression of uncoupling proteins in subcutaneous adipose tissue, lung, and muscle of neonatal pigs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005, vol. 288, no. 6, s. R1536-R1542.
137. MÜLLER, S.; SEITZ, H.J. Cloning of a cDNA for the FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase from rat liver and its regulation by thyroid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, vol. 91, s. 10581-10585.
138. MUÑOZ, A.; BERNAL, J. Biological activities of thyroid hormone receptor. *Eur. J. Endocrinol.* 1997, vol. 137, s. 433-445.

139. MURASE, T.; KONDO, H.; HASE, T.; TOKIMITSU, I.; SAITO, M. Abundant expression of uncoupling protein-2 in the small intestine: up-regulation by dietary fish oil and fibrates. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001, vol. 1530, no. 1, s. 15-22.
140. MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. *Harperova biochemie.* Jinočany: H&H, 1998.
141. NEDERGAARD, J.; CANNON, B. The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Exp. Physiol.* 2003, vol. 88, no. 1, s. 65-84.
142. NEDERGAARD, J.; GOLOZOUBOVA, V.; MATTHIAS, A.; ASADI, A.; JACOBSSON, A.; CANNON, B. UCP1: the only protein able to mediate adaptivenon-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001, vol. 1504, no. 1, s. 82-106.
143. NEDERGAARD, J.; RICQUIER, D.; KOZAK, L.P. Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO reports.* 2005, vol. 6, no. 10, s. 917-921.
144. NÉGRE-SALVAYRE, A.; HIRTZ, C.; CARRERA, G.; CAZENAVE, R.; TROLY, M.; SALVAYRE, R.; PÉNICAUD, L.; CASTEILLA, L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* 1997, vol. 11, s. 809-815.
145. NICHOLLS, D.G.; RIAL, E. A History of the First Uncoupling Protein, UCP1. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999, vol. 31, no. 5, s. 399-406.
146. NÜBEL, T.; RICQUIER, D. Respiration under Control of Uncoupling Proteins: Clinical Perspective. *Horm. Res.* 2006, vol. 65, s. 300-310.
147. OPPENHEIMER, J.H.; SILVA, E.; SCHWARTZ, H.L.; SURKS, M.I. Stimulation of hepatic mitochondrial alpha-glycerophosphate dehydrogenase and malic enzyme by l-triiodothyronine. Characteristics of the response with specific nuclear thyroid hormone binding sites fully saturated. *J. Clin. Invest.* 1977, vol. 59, s. 517-527.
148. PARADIS, É.; CLAVEL, S.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D.; RICHARD, D. Uncoupling protein 2. a novel player in neuroprotection. *Trends Mol. Med.* 2003, vol. 9, no.12, s. 522-525.
149. PECQUEUR, C.; ALVES-GUERRA, M.C.; GELLY, C.; LÉVI-MEYRUEIS, C.; COUPLAN, E.; COLLINS, S.; RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F.; MIROUX, B. Uncoupling Protein 2, in Vivo Distribution, Induction upon Oxidative Stress, and

- Evidence for Translation Regulation. *J. Biol. Chem.* 2001, vol. 276, no. 12, s. 8705-8712.
150. PECQUEUR, C.; CASSARD-DOULCIER, A.M.; RAIMBAULT, S.; MIROUX, B.; FLEURY, C.; GELLY, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. Functional Organization of the Human Uncoupling Protein-2 Gene, and Juxtaposition to the Uncoupling Protein-3 Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, vol. 255, no. 1, s. 40-46.
 151. PETTY, K.J.; DESVERGNE, B.; MITSUHASHI, T.; NIKODEM V.M. Identification of a thyroid hormone response element in the malic enzyme gene. *J. Biol. Chem.* 1990, vol. 265, s. 7395-7400.
 152. PFAFFL, M.W.; VANDESOMPELE, J.; KUBISTA, M. *Real-Time PCR: Current Technology and Application*. Caister Academic Press, 2009. Kapitola 5: Data Analysis Software, s. 65-83. ISBN 978-1-904455-39-4
 153. PORTER, R.K. Mitochondrial proton leak: a role for uncoupling proteins 2 and 3? *Biochim. Biophys. Acta.* 2001, vol. 1504, s. 120-127.
 154. PRENTKI, M.; CORKEY, B.E. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes.* 1996, vol. 45, no. 3, s. 273-283.
 155. RABELO, R.; REYES, C.; SCHIFMAN, A.; SILVA, J.E. Interactions Among Receptors, Thyroid Hormone Response Elements, and Ligands in the Regulation of the Rat Uncoupling Protein Gene Expression by Thyroid Hormone. *Endocrinology.* 1996, vol. 137, no. 8, s. 3478-3487.
 156. RADONIĆ, A.; THULKE, S.; MACKAY, I.M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, vol. 313, s. 856-862.
 157. RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* 2000 A, vol. 345, s. 161-179.
 158. RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J. Physiol.* 2000 B, vol. 529, s. 3-10.

159. RICQUIER, D.; FLEURY, C.; LAROSE, M.; SANCHIS, D.; PECQUEUR, C.; RAIMBAULT, S.; GELLY, C.; VACHER, D.; CASSARD-DOULCIER, A.M.; LÉVI-MEYRUEIS, C.; CHAMPIGNY, O.; MIROUX, B.; BOUILLAUD, F. Contributions of studies on uncoupling proteins to research on metabolic diseases. *J. Intern. Med.* 1999, vol. 245, s. 637-642.
160. RICHARD, D.; CLAVEL, S.; HUANG, Q.; SANCHIS, D.; RICQUIER, D. Uncoupling protein 2 in the brain: distribution and function. *Biochem. Soc. Trans.* 2001, vol. 29, s. 812-817.
161. RICHARD, D.; RIVEST, R.; HUANG, Q.; BOUILLAUD, F.; SANCHIS, D.; CHAMPIGNY, O.; RICQUIER, D. Distribution of the uncoupling protein 2 mRNA in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 1998, vol. 397, no. 4, s. 549-560.
162. ROUSSET, S.; ALVES-GUERRA, M.C.; MOZO, J.; MIROUX, B.; CASSARD-DOULCIER, A.M.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *Diabetes.* 2004, vol. 53, suppl. 1, s. S130-S135.
163. ROUSSET, S.; MOZO, J.; DUJARDIN, G.; EMRE, Y.; MASSCHELEYN, S.; RICQUIER, D.; CASSARD-DOULCIER, A.M. UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. *FEBS Lett.* 2007, vol. 581, s. 479-482.
164. RUSSELL, S.M.; MAYER, R.J. Degradation of transplanted rat liver mitochondrial-outer-membrane proteins in hepatoma cells. *Biochem. J.* 1983, vol. 216, s. 163–175.
165. SAITO, K.; NISHIKAWA, J.I.; IMAGAWA, M.; NISHAHARA, T.; MATSUO, M. Molecular evidence of complex tissue- and sex-specific mRNA expression of the rat α_{2u} -globulin multigene family. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2000, vol. 272, s. 337-344.
166. SALEH, M.C.; WHEELER, M.B.; CHAN, C.B. Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator. *Diabetologia.* 2002, vol. 45, s. 174-187.
167. SANCHIS, D.; FLEURY, C.; CHOMIKI, N.; GOUBERN, M.; HUANG, Q.; NEVEROVA, M.; GRÉGOIRE, F.; EASLICK, J.; RAIMBAULT, S.; LÉVI-MEYRUEIS, C.; MIROUX, B.; COLLINS, S.; SELDIN, M.; RICHARD, D.; WARDEN, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents,

- and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* 1998, vol. 273, no. 51, s. 34611-34615.
168. SHIMIZU, H.; OH-I, S.; OKADA, S.; MORI, M. Leptin Resistance and Obesity. *Endocr. J.* 2007, vol. 54, no. 1, s. 17-26.
169. SCHÄFFLER, A. *Vademecum lékaře, 4. ed.* (Schäffler A., Braun J., Renz U., eds.). Praha: Galén, 1993. Referenční rozsahy a diferenciální diagnóza patologických laboratorních parametrů, s. 696-711.
170. SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1987, vol. 166, s. 368-379.
171. SCHNEIDER, W.C.; HOGEBROOM, G.H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 1950, vol. 183, s. 123-128.
172. SCHON, E.A. Mitochondrial genetics and disease. *TIBS.* 2000, vol. 25, s. 555-560.
173. SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid. Res.* 1996, vol. 37, s. 907-925.
174. SCHRAUWEN, P.; HESSELINK, M. UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J. Exp. Biol.* 2002, vol. 205, s. 2275-2285.
175. SCHRAUWEN, P.; WALDER, K.; RAVUSSIN, E. Human Uncoupling Proteins and Obesity. *Obesity Research.* 1999, vol. 7, no. 1, s. 97-105.
176. SKULACHEV, V.P. Anion Carriers in Fatty Acid-Mediated Physiological Uncoupling. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999, vol. 31, no. 5, s. 431-445.
177. SKULACHEV, V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998, vol. 1363, s. 100-124.
178. SLUSE, F.E.; JARMUSZKIEWICZ, W.; NAVET, R.; DOUETTE, P.; MATHY, G.; SLUSE-GOFFART, C.M. Mitochondrial UCPs: New insights into regulation and impact. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006, vol. 1757, s. 480-485.
179. SOLANES, G.; VIDAL-PUIG, A.; GRUJIC, D.; FLIER, J.S.; LOWELL, B.B. The Human Uncoupling Protein-3 Gene. *J. Biol. Chem.* 1997, vol. 272, no. 41, s. 25433-25436.

180. STRAKOVÁ, N.; EHRMANN, J.; KOLÁŘ, Z. PPARs & NÁDORY. *Klinická onkologie*. 2005, vol. 18, no. 2, s. 41-44.
181. STUART, J.A.; CADENAS, S.; JEKABSON, M.B.; ROUSSEL, D.; BRAND, M.D. Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001, vol. 1504, s. 144-158.
182. SWIERCZYNSKI, J.; SCISLOWSKI, P.; ALEKSANDROWICZ, Z. High activity of alpha-glycerophosphate oxidation by human placental mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*. 1976, vol. 429, s. 46-54.
183. TANNER, A.J.; DICE, J.F. Batten disease and mitochondrial pathways of proteolysis. *Biochem. Mol. Med.* 1996, vol. 57, s. 1-9.
184. TAUB, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, vol. 5, no. 10, s. 836-847.
185. THOMPSON, C.C.; WEINBERGER, C.; LEBO, R.; EVANS, R.M. Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science*. 1987, vol. 237, s. 1610-1614.
186. TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; KIM, H.; EZAKI, O. Up-Regulation of Liver Uncoupling Protein-2 mRNA by either Fish Oil Feeding or Fibrate Administration in Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, vol. 257, no. 3, s. 879-885.
187. UEDA, K.; TANIZAWA, Y.; ISHIHARA, H.; KIZUKI, N.; OHTA, Y.; MATSUTANI, A.; OKA, Y. Overexpression of mitochondrial FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase does not correct glucose-stimulated insulin secretion from diabetic GK rat pancreatic islets. *Diabetologia*. 1998, vol. 41, no. 6, s. 649-653.
188. UMESONO, K.; EVANS, R.M. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*. 1989, vol. 57, s. 1139-1146.
189. VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002, vol. 3, no. 7, s. research 0034.1-0034.11.
190. VIDAL-PUIG, A.; SOLANES, G.; GRUJIC, D.; FLIER, J.S.; LOWELL, B.B. UCP3: An Uncoupling Protein Homologue Expressed Preferentially and Abundantly in Skeletal Muscle and Brown Adipose Tissue. *Biochem. Biophys.*

- Res. Commun.* 1997, vol. 235, s. 79-82.
191. VOCI, A.; DEMORI, I.; FRANZI, A.T.; FUGASSA, E.; GOGLIA, F.; LANNI, A. Uncoupling protein 2 mRNA expression and respiratory parameters in Kupffer cells isolated from euthyroid and hyperthyroid rat livers. *Eur. J. Endocrinol.* 2001, vol. 145, s. 317-322.
192. VOET, D.; VOET, J.G. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, a.s., 1995. Kapitola 20: Transport elektronů a oxidační fosforylace, s. 590-625. ISBN 80-85605-44-9.
193. WALDER, K.; NORMAN, R.A.; HANSON, R.L.; SCHRAUWEN, P.; NEVEROVA, M.; JENKINSON, C.P.; EASLICK, J.; WARDEN, C.H.; PECQUEUR, C.; RAIMBAULT, S.; RICQUIER, D.; HARPER, M.; SILVER, K.; SHULDINER, A.R.; SOLANES, G.; LOWELL, B.B.; CHUNG, W.K.; LEIBEL, R.L.; PRATLEY, R.; RAVUSSIN, E. Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima Indians. *Hum. Mol. Genet.* 1998, vol. 7, no. 9, s. 1431-1435.
194. WANG, M.Y.; SHIMABUKURO, M.; LEE, Y.; TRINH, K.Y.; CHEN, J.L.; NEWGARD, C.B.; UNGER, R.H. Adenovirus-Mediated Overexpression of Uncoupling Protein-2 in Pancreatic Islets of Zucker Diabetic Rats Increases Oxidative Activity and Improves b-Cell Function. *Diabetes.* 1999, vol. 48, no. 5, s. 1020-1025.
195. WEINBERGER, C.; THOMPSON, C.C.; ONG, E.S.; LEBO, R.; GRUOL, D.J.; EVANS, R.M. The c-erbA gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature.* 1986, vol. 324, s. 641-646.
196. WEITZEL, J.M.; GROTT, S.; RADTKE, C.; KUTZ, S.; SEITZ, H.J. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 2000, vol. 381, s. 611-614.
197. WEITZEL, J.M.; IWEN, K.A.; SEITZ, H.J. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp. Physiol.* 2003, vol. 88, s. 121-128.
198. WEITZEL, J.M.; KUTZ, S.; RADTKE, C.; GROTT, S.; SEITZ, H.J. Hormonal regulation of multiple promoters of the rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene: identification of a complex hormoneresponse element in the ubiquitous promoter B. *Eur. J. Biochem.* 2001 A, vol. 268, s. 4095– 4103.

199. WEITZEL, J.M.; RADTKE, C.; SEITZ, H.J. Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat. *Nucleic Acids Res.* 2001 B, vol. 29, s. 5148–5155.
200. WOLKOW, C.A.; ISER, W.B. Uncoupling protein homologs may provide a link between mitochondria, metabolism and lifespan. *Ageing Res. Rev.* 2006, vol. 5, no. 2, s. 196-208.
201. WU, Q.; GONG, D.; TIAN, N.; ZHU, L.; GUAN, L.; YANG, M.; YUAN, B.; QIU, Q.; LV, H.; ZOU, Y. Protection of Regenerating Liver After Partial Hepatectomy from Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity in Rats: Roles of Mitochondrial Uncoupling Protein 2 and ATP Stores. *Dig. Dis. Sci.* 2009, vol. 54, s. 1918-1925.
202. YEN, P.M. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiol. Rev.* 2001, vol. 81, no. 3, s. 1097-1142.
203. YEN, P.M.; CHIN, W.W. New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *Trends Endocrinol. Metab.* 1994, vol. 5, s. 65– 72.
204. ZHANG, C.Y.; BAFFY, G.; PERRET, P.; KRAUSS, S.; PERONI, O.; GRUJIC, D.; HAGEN, T.; VIDAL-PUIG, A.J.; BOSS, O.; KIM, Y.B.; ZHENG, X.X.; WHEELER, M.B.; SHULMAN, G.I.; CHAN, C.B.; LOWELL, B.B. Uncoupling Protein-2 Negatively Regulates Insulin Secretion and Is a Major Link between Obesity, β Cell Dysfunction, and Type 2 Diabetes. *Cell.* 2001, vol. 105, s. 745-755.
205. ZHOU, Y.T.; SHIMABUKURO, M.; KOYAMA, K.; LEE, Y.; WANG, M.Y.; TRIEU, F.; NEWGARD, C.B.; UNGER, R.H. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997, vol. 94, no. 12, s. 6386-6390.