

Abstrakt

V teoretické části disertační práce bylo provedeno hledání nových homologů doposud známých UCP - byli tedy vyhledáváni noví členové UCP rodiny. Nové UCP byly nalezeny u octomilky (*Drosophila melanogaster*) (čtyři nové UCP), jedno u hlístice *Caenorhabditis elegans*, jedno v modelovém organismu *Dictyostelium discoideum* a jedno UCP v rostlině huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*). Sestrojené dendrogramy umístily dříve známé a tyto nově anotované UCP do dvou hlavních skupin – „klastru UCP4“ (kam patří krom UCP4 a BMCP/UCP5 všechna nově identifikovaná UCP) a „klasický“ klastr, zahrnující UCP1, 2, 3 a všechna PUMP. Zřetelná všudypřítomnost UCP4 v organismech živočišné říše by mohla ukazovat na jeho roli jako ancestrálního UCP.

V experimentální části disertační práce byla studována role vybraných aminokyselinových zbytků pro protonový transport (a také pro transport chloridových aniontů) a pro vazbu regulačních nukleotidů. Byly zkonstruovány tři mutanty UCP1 v oblasti prvního α -helixu (D27V, T30A and C24A-D27V-T30A) a dvě UCP s mutací v oblasti druhého matrixového úseku (H145L-H147L and R152L). Tyto mutantní UCP1 byly následně exprimovány a inkorporovány do proteolipozómů obsahujících indikátory H^+ nebo Cl^- . Obdobným postupem byly připraveny také proteolipozómy s nemutovaným UCP1 „divokého typu“. Naměřené transportní vlastnosti nemutovaného UCP1 odpovídaly publikovaným údajům.

Obojživelný (*Saccharomyces cerevisiae/Escherichia coli*) vektor pCGS110 byl využit jako nosič cDNA pro potkaní UCP1. Dále použitá metoda bodově-řízené mutagenese je založena na PCR. Výchozí (nezmutované) vlákno DNA bylo následně degradováno pomocí enzymu Dpn I, takže do bakterií byly transformovány pouze geny nesoucí kodóny pro příslušně změněné aminokyseliny. Transformované klony byly vyselektovány pomocí ampicilinové resistance, vnesené vektorem. Obojživelný vektor nesoucí příslušný gen UCP1 byl prolifеровán v kultuře *E. coli*. DNA izolovaná z této kultury byla sekvencována pro potvrzení záměny v příslušných kodónech. Vybrané klony byly pak elektroporovány do ura^- kvasinek. Exprese UCP1 byla stimulována přidávkem galaktózy. Kvasinková kultura byla sklizena při $OD_{600} = 1$, mitochondrie s heterologně exprimovaným UCP1 byly izolovány postupnými centrifugacemi při různých hodnotách RCF. UCP1 bylo uvolněno detergentem oktypentaoxyethylenem a byla přidána směs lipidů L- α -fosfatidylcholinu, kardiolipinu z bovinního srdce a kyseliny L- α -fosfatidové, aby došlo k tvorbě proteoliposomů. Protontransportní (H^+) a aniontransportní (Cl^-) charakteristiky byly měřeny prostřednictvím zhášení indikátoru SPQ.

U všech zkonstruovaných mutantů UCP1 nebyly ve srovnání s UCP1 divokého typu zaznamenány žádné změny transportu Cl^- , ani nebyla nijak změněna jejich afinita k nukleotidům. V mutovaných UCP1 D27V, T30A a R152L byla snížena hodnota V_{max} pro protonový transport přinejmenším o 50%. V mutovaném UCP1 C24A-D27V-T30A byl protonový transport zcela potlačen. Afinita pro kyselinu laurovou (K_m) byla snížena u všech mutovaných UCP1 (výsledky pro mutant H145L-H147L se lišily mezi měřeními).