

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Ilariia Irodenko**

Metabolismus tukové tkáně a geneticky modifikované myší modely  
Adipose tissue metabolism and genetically modified murine models

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Kristina Bardová, Ph.D.

Praha, 2018

**Poděkování:**

Děkuji své školitelce Mgr. Kristině Bardové, Ph.D za odborné vedení, čas a velkou trpělivost, se kterou se mi věnovala během vypracovávání bakalařské práce. Dále bych ráda poděkovala celému týmu z Oddělení biologie tukové tkáně FGÚ AV ČR za vstřícný přístup, podnětné připomínky a přátelské prostředí a v neposlední řadě i své rodině za podporu během mého studia.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Mgr. Kristiny Bardové, Ph.D. a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, dne 7.05.2018

Ilariia Irodenko

## **Abstrakt**

Tuková tkáň hraje důležitou roli v hospodaření s energií v těle. Metabolismus tukové tkáně zahrnuje procesy lipolýzy a lipogeneze, kterými tuková tkáň kontroluje mobilizaci a ukládání lipidů a jejich distribuci v organismu. Kromě toho je tuková tkáň endokrinním orgánem, který produkuje cytokiny a adipokiny, a tím zajišťuje komunikaci s jinými orgány a tkáněmi. Hlavním procesem lipogeneze je syntéza triacylglycerolů, která zahrnuje enzymy monoacylglycerol-acyltransferázu a diacylglycerol-acyltransferázu pro ukládání triacylglycerolů ve formě tukových kapének. Naopak hlavní enzymy lipolýzy triacylglycerolová lipáza a hormon senzitivní lipáza zabezpečují dostatek energie ostatním tkáním. Oxidace mastných kyselin v hnědé tukové tkáni vytváří teplo v těle pomocí odpřahujícího proteinu 1. Signální dráhy účastníci se lipolýzy a termogeneze zahrnují adrenergní receptory. Studium termogenní funkce odpřahujícího proteinu a metabolismu tukové tkáně může být využito i při léčbě obezity a metabolických poruch.

## **Klíčová slova:**

Tuková tkáň, lipolýza, lipogeneze, glukózová homeostáza, cytokiny, adipokiny, triacylglyceroly, monoacylglycerol-acyltransferáza, diacylglycerol-acyltransferáza, odpřahující protein, termogeneze

## **Abstract**

Adipose tissue plays an important role in energy and glucose homeostasis. Adipose tissue metabolism includes lipolysis and lipogenesis processes which control lipid mobilization, storage and distribution in the body. In addition to that adipose tissue is recognized as an endocrine organ which generates cytokines and adipokines for communication with other organs and tissues. The major process of lipogenesis is triacylglycerol synthesis which comprises such enzymes as monoacylglycerol acyltransferase and diglyceride acyltransferase for triacylglycerol storage in a form of lipid droplets. The other way around main enzymes of lipolysis adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase produce sufficient amount of energy for other tissues. Lipid combustion in brown adipose tissue produces heat in the body through the function of uncoupling protein 1. Signaling pathways of lipolysis and thermogenesis comprise adrenergic receptors. Study of thermogenic function of uncoupling protein and adipose tissue metabolism can be useful for the treatment of obesity and metabolic disorders.

## **Key words:**

Adipose tissue, lipolysis, lipogenesis, glucose homeostasis, cytokines, adipokines, triacylglycerol, monoacylglycerol acyltransferase, diglyceride acyltransferase, uncoupling protein, thermogenesis

## Seznam zkratek

ABHD5	koaktivátor 1-acylglycerol-3-fosfát-O-acyltransferázy (coactivator of 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase)
ACAT	acyl-CoA cholesterol-acyltransferáza (acyl-CoA cholesterol acyltransferase)
ACTH	adrenokortikotropní hormon (adrenocorticotropic hormone)
Acyl-CoA	acyl koenzym A (acyl coenzyme A)
ADP	adenosindifosfát (adenosine diphosphate)
ADRB3	$\beta_3$ -adrenoreceptor ( $\beta_3$ -adrenoreceptor)
AMP	adenosinmonofosfát (adenosine monophosphate)
AMPK	AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMP-activated protein kinase)
aP2	adipocytový protein 2 (adipocyte protein 2)
ATGL	triacylglycerolová lipáza (adipose triglyceride lipase)
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BAT	hnědá tuková tkáň (brown adipose tissue)
CAC	citratový cyklus (citric acid cycle)
CACT	karnitin-acylkarnitin translokáza (carnitine-acylcarnitine translocase)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
CEH	cholesterol ester hydroláza (cholesterol ester hydrolase)
CPT1	karnitin palmitoyl transferáza 1 (carnitine palmitoyltransferase 1)
CPT2	karnitin palmitoyl transferáza 2 (carnitine palmitoyltransferase 2)

CREB	protein vážící cAMP responzivní element (cAMP response element-binding protein)
DAG	diacylglycerol (diglyceride)
DGAT	diacylglycerol-acyltransferáza (diglyceride acyltransferase)
ER	endoplazmatické retikulum (endoplasmic reticulum)
ERK	extracelulárně regulovaná kináza (extracellular signal-regulated kinase)
FABP	protein vážící mastné kyseliny (fatty acid-binding protein)
FADH	flavinadenindinukleotid (flavin adenine dinucleotide)
G-3-P	glycerol-3-fosfát (glycerol-3-phosphate)
GLUT1	glukózový přenašeč typu 1 (glucose transporter type 1)
GPAT	glycerol-3-fosfát acyltransferáza (glycerol-3-phosphate acyltransferase)
GSIS	sekrece inzulínu stimulovaná glukózou (glucose-stimulated insulin secretion)
HL	játerní lipáza (hepatic lipase)
HSL	hormon senzitivní lipáza (hormone-sensitive lipase)
IDL	lipoprotein o střední hustotě (intermediate-density lipoprotein)
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low-density lipoprotein)
LPA	kyselina lyzofasfatidová (lysophosphatidic acid)
LPAAT	LPA acyltransferáza (LPA acyltransferase)
LPL	lipoproteinová lipáza (lipoprotein lipase)
MAG	monoacylglycerol
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein kinase)

MEK	kináza mitogenem aktivované protein kinázy (mitogen-activated protein kinase)
MGAT	monoacylglycerol-acyltransferáza (monoacylglycerol acyltransferase)
MGL	monoacylglycerolová lipáza (monoacylglycerol lipase)
MK	mastné kyseliny
MKK	kinázy mitogen aktivovaných protein kináz (mitogen-activated protein kinase)
mTOR	mechanistický cíl rapamycinu (mechanistic target of rapamycin)
mTORC	mTOR komplex (mechanistic target of rapamycin complex)
NADH	nikotinamidadeninukleotid (nicotinate adenine dinucleotide)
NEFA	neesterifikované mastné kyseliny (non-esterified fatty acids)
PA	kyselina fosfatidová (phosphatidic acid)
PAP	PA fosforyláza (PA phosphorylase)
PC	fosfatidylcholin (phosphatidylcholine)
PDH	pyruvátdehydrogenáza (pyruvate dehydrogenase)
PE	fosfatidylethanolamin (phosphatidylethanolamine)
PET-FDG	pozitronová emisní skenovací tomografie s použitím 2- <sup>18</sup> F-2-fluoro-2-deoxy-D-glukózy (fluorodeoxyglucose positron emission tomography)
PKA	protein kináza A (protein kinase A)
PKC	protein kináza C (protein kinase C)
PLC	fosfolipáza C (phospholipase C)

Pnpla2	protein obsahující patatinovou doménu 2 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 2)
PPAR $\alpha$	peroxizomálním proliferátorem aktivovaný receptor alfa (peroxisome proliferator-activated receptor alfa)
TAG	triacylglycerol (triacylglycerol)
TM	transmembranová doména (transmembrain domain)
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
UCP1	odpřahující protein 1 (uncoupling protein 1)
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)
WAT	bílá tuková tkáň (white adipose tissue)



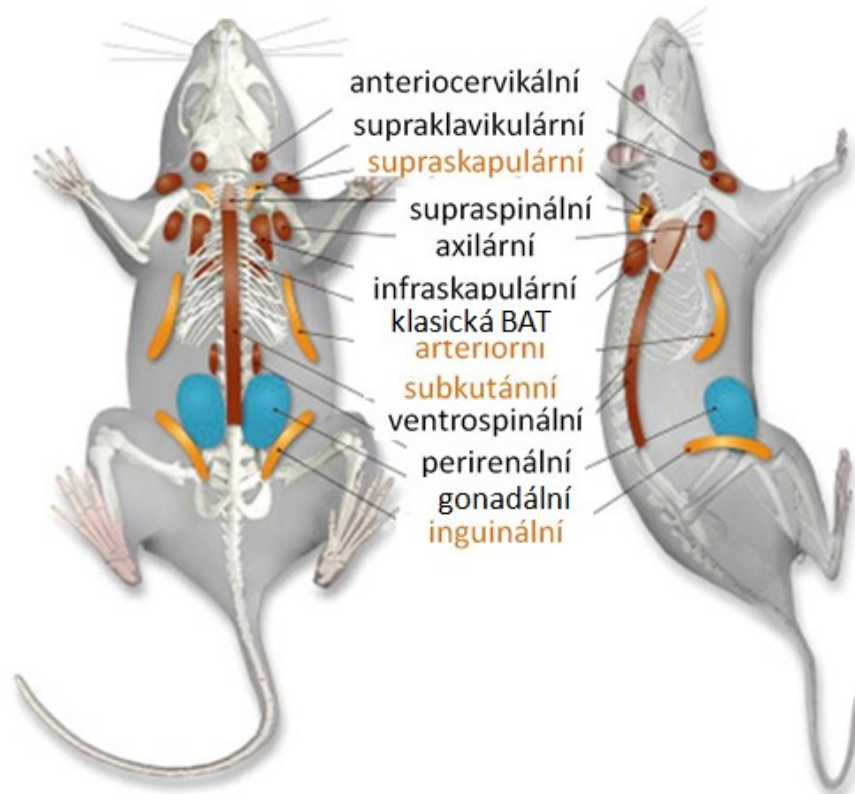
## Obsah

Úvod.....	1
Metabolizmus v tukové tkáni .....	4
Lipolýza.....	4
Lipogeneze.....	5
Klíčové enzymy tukové tkáně a jejich genetické modely .....	8
Triacylglycerolová lipáza (ATGL).....	8
Hormon senzitivní lipáza (HSL).....	10
$\beta_3$ -adrenoreceptor (ADRB3).....	12
Diacylglycerol acyltransferázy (DGAT).....	15
Odprahující protein 1 (UCP1) .....	17

## Úvod

Tuková tkáň je pojivovou tkání, která hraje důležitou roli v celotělovém metabolismu, termogenezi, mechanické ochraně vnitřních orgánů a v reprodukci organismu. Kromě hospodaření s energií a tvorby tepla je tuková tkáň důležitým endokrinním orgánem, který reguluje mnoho fyziologických procesů pomocí sekrece adipokinů, lipidů, cytokinů a jiných faktorů. Tuková tkáň se skládá z adipocytů a dalších buněčných typů, které se souhrnně nazývají stroma-vaskulární frakce. Do této frakce buněk patří preadipocyty, fibroblasty, endotel cév a kapilár a buňky imunitního systému, zejména makrofágy.

U savců existují dva hlavní typy tukové tkáně, které se liší na molekulární, funkční i histologické úrovni. Bílá tuková tkáň (WAT) je zásobárnou energie, zatímco hnědá tuková tkáň (BAT) generuje teplo (Berry, Stenesen et al. 2013). U savců je tuková tkáň tvořená několika samostatnými depy: anteriocervikálním, supraklavikulárním, supraskapulárním, supraspinálním, axilárním, infraskapulárním, klasickou interskapulární BAT, anteriorním subkutánním, ventrospinálním, perirenálním, gonadálním (epididymálním nebo periovariálním) a inguinálním tukovým depem (obr. 1) (Zhang, Hao et al. 2018).



**Obr. 1: Schéma lokalizace tukových dep u myši**

(převzato a upraveno podle (Zhang, Hao et al. 2018))

Bílé adipocyty skladují energii ve formě lipidů a uvolňují energii rozkladem lipidů a oxidací mastných kyselin. Tato funkce je pro organismus nezbytná, protože umožňuje získávat energii v obdobích mezi příjmem potravy a v průběhu dlouhodobého hladovění. Sférický tvar bílých adipocytů umožňuje dokonale plnit funkci ukládání energie, protože jen tento tvar zajišťuje maximální využití prostoru. Přibližně 90% objemu bílého adipocytu zaujímá cytoplazmatická tuková kapénka, která se skládá z triacylglycerolů a esterů cholesterolu.

Hnědé adipocyty jsou termogenní buňky, které zajišťují udržení stálé tělesné teploty, když jsou hlodavci a především mláďata větších savců vystaveni teplotám pod termoneutrální zónou (přibližně 28-35°C). Hnědé adipocyty skladují triacylglyceroly ve velkém množství malých tukových kapének, což umožňuje rychlou aktivaci uvolnění mastných kyselin pro zajištění

termogenní funkce. Tvorba tepla je zajištěna odpráhujícím proteinem 1 (UCP1), který se nachází na vnitřní mitochondriální membráně. Po stimulu ze zakončení neuronů sympatického nervového systému dojde k výlevu noradrenalinu a zejména přes  $\beta_3$ -adrenoreceptory se aktivuje funkce UCP1 proteinu a dojde k rozprážení oxidační fosforylace, v důsledku čehož se energie uvolní ve formě tepla.

Relativně nedávno byla identifikována BAT u dospělých lidí. Její aktivitu lze sledovat pomocí pozitronové emisní skenovací tomografií s použitím 2-<sup>18</sup>F-2-fluoro-2-deoxy-D-glukózy (PET-FDG). Příjem [<sup>18</sup>F] FDG v BAT byl obecně ztotožněn s termogenezí. Nicméně předpoklad, že příjem glukózy odráží termogenní aktivitu, není správný, jak ukázali ve své práci Olsen a spoluautoři (Olsen, Csikasz et al. 2017).

WAT i BAT mají rozdílné cévní a nervové zásobení. BAT má hustou kapilární síť a větší hustotu nervových vláken v porovnání s WAT. Nejvíce jsou v tukové tkáni zastoupená noradrenergická sympatická nervová vlákna (Smorlesi, Frontini et al. 2012).

I když bílé i hnědé adipocyty plní různé funkce, nachází se společně v tukových depech a dohromady vytváří jeden prostorově i funkčně provázaný „tukový orgán“, skládající se z více tukových dep. To, že se hnědé i bílé adipocyty vyskytují v tukových depech často pohromadě, naznačuje možnost reciproční transdiferenciace mezi hnědými a bílými adipocyty. Farmakologické ovlivnění transdiferenciace z bílých do hnědých adipocytů může být důležité pro boj s obezitou a diabetem 2. typu. Vitali a spoluautoři ukázali, že na histologické úrovni tuková depa C57BL/6J myši, které jsou náchylné k obezitě a diabetu 2. typu, obsahují bílé a hnědé adipocyty. Kvantitativní analýza ukázala, že vystavení těchto myši chladu vyvolalo zvýšení počtu hnědých adipocytů a téměř stejnou redukci bílých adipocytů. Zvýšení počtu hnědých adipocytů bylo doprovázeno zvýšením hustoty noradrenergických parenchymatických nervových vláken (Vitali, Murano et al. 2012).

Tuková tkáň hraje také patogenní roli v abnormálním intracelulárním ukládání tuku v játrech a svalech. Tuková tkáň může způsobit inzulínovou rezistenci nadměrným uvolňováním volných mastných kyselin a pozměněnou sekrecí adipokinů, které fungují jako parakrinní faktory v tukové tkáni a také jako endokrinní faktory ovlivňující metabolismus glukózy a lipidů v dalších tkáních. Přestože obezita je důležitým faktorem způsobující inzulínovou rezistenci,

inzulínová rezistence není vždy podmíněná obezitou. Důležitým faktorem je relativní distribuce tuku v lidském těle. Akumulace tuku ve viscerálních tukových depech, játrech a svalech přispívá k inzulínové rezistenci. Zvětšení objemu viscerální tukové tkáně souvisí s infiltrací makrofágů, sníženou sekrecí adiponektinu a uvolněním prozánětlivých faktorů (Lara-Castro and Garvey 2008).

Souhrnem je možné říci, že tuková tkáň je tvořená bílými a hnědými adipocyty, které jsou zastoupené v různých tukových depech a tvoří společně tukový orgán, který má významnou fyziologickou funkci.

## **Metabolismus v tukové tkáni**

Základní metabolické procesy, probíhající v tukové tkáni jsou lipolýza a lipogeneze. Jejich regulací tuková tkáň kontroluje mobilizaci a ukládání lipidů a jejich distribuci v organismu.

### **Lipolýza**

Tuky jsou nejefektivnějším zdrojem energie pro většinu eukaryotických organismů. 1 g tuků obsahuje 37 kJ energie, zatímco 1 g sacharidů obsahuje 16 kJ a 1 g proteinů obsahuje 17 kJ energie. To znamená, že tuky poskytují v oxidačním metabolismu dvakrát více energie než sacharidy nebo proteiny o stejné hmotnosti. Zásobní formou glukózy je polární glykogen, který je skladován v hydratované formě. Hydratovaná forma glykogenu obsahuje dvakrát více vody než glykogen v suché hmotnosti, zatímco tuky jsou nepolární a jsou skladovány v nevodném prostředí. To znamená, že tuky při stejné hmotnosti poskytují šestkrát více metabolické energie, než glykogen v hydratované formě (Voet and Voetova 1994). Vysoká koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) může být pro buňky toxická, a proto jsou mastné kyseliny (MK) esterifikované glycerolem nebo cholesterolem a jsou uloženy ve formě triacylglycerolů (TAG) a esterů cholesterolu v tukových kapénkách. U savců je nejvíce tuků uloženo ve WAT. Když organismus potřebuje uvolnit uloženou energii, MK se uvolňují z tukových kapének procesem lipolýzy (Zimmermann, Lass et al. 2009). Lipolýza je řízena komplexně, což zahrnuje účinek lipolytických a anti-lipolytických hormonů na receptory a tím spuštění určité signální dráhy (Holm, Osterlund et al. 2000). Lipolýza je zajištěna enzymy lipázami, které hydrolyzují TAG a estery cholesterolu. U savců lipolýzu zajišťují tři lipázy: triacylglycerolová lipáza (ATGL), hormon senzitivní lipáza (HSL) a monoacylglycerolová lipáza

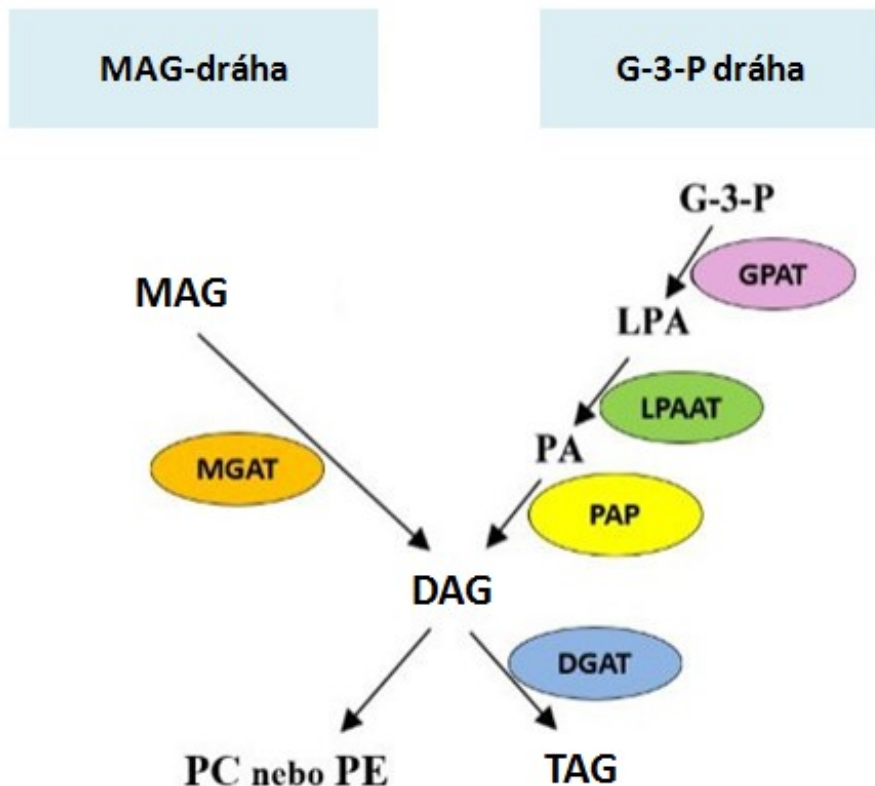
(MGL). ATGL má schopnost hydrolýzy cholesterol esterů a katalyzuje první krok degradace TAG na diacylglycerol (DAG). DAG je posléze hydrolyzován pomocí HSL na monoacylglycerol (MAG). MAG je v posledním kroku hydrolyzován na glycerol. Při každém kroku je uvolněna jedna molekula MK (Viscarra and Ortiz 2013).

HSL vykazuje schopnost hydrolyzovat TAG i DAG. Přestože myši, postrádající HSL, nejsou obézní, jejich adipocyty vykazují za podmínek  $\beta$ -adrenergní stimulace snížené uvolňování glycerolu. V tomto myším modelu je v některých tkáních pozorována akumulace DAG místo TAG. To znamená, že HSL je limitujícím enzymem zejména v hydrolýze DAG. Na druhou stranu ATGL zajišťuje hydrolýzu TAG za bazálních i adrenergně stimulovaných podmínek. Bylo také zjištěno, že oba enzymy se účastní hydrolýzy TAG, která je zprostředkována tumor nekrotizujícím faktorem alfa (TNF- $\alpha$ ), který zajišťuje energetickou homeostázu a inzulínovou rezistenci. I když ATGL i HSL mají afinitu k TAG i DAG, ATGL vykazuje vyšší specifitu vůči TAG, zatímco HSL má vyšší specifitu vůči DAG (Yang, Zhang et al. 2011).

## **Lipogeneze**

### ***Syntéza triacylglycerolů***

Existují dvě hlavní biochemické dráhy pro syntézu TAG (obr. 2). V tenkém střevě jsou TAG z potravy nejprve hydrolyzované pomocí pankreatických lipáz na volné mastné kyseliny a 2-monoacylglycerol (MAG), které jsou následně vstřebávány enterocyty. V enterocytech probíhá monoacylglycerolová dráha (MAG-dráha). MAG-dráha začíná acylací monoacylglycerolu pomocí monoacylglycerol-acyltransferázy (MGAT). MAG-dráha se také uplatňuje v tukové tkáni, kde zajišťuje akumulaci energie ve formě TAG. Další dráhou pro syntézu TAG je glycerol-3-fosfatová dráha (G-3-P dráha). G-3-P dráha probíhá v játrech a tukové tkáni. G-3-P dráha začíná acylací glycerol-3-fosfátu. Výsledkem této reakce je lyzofosfatidová kyselina (LPA), která se další acylací a defosforylací přemění na DAG. Na konci obou drah je DAG přeměněn na TAG pomocí diacylglycerol-acyltransferázy (DGAT), která má dvě izoformy DGAT1 a DGAT2 (Cheng, Iqbal et al. 2008).



**Obr. 2: Dvě metabolické dráhy syntézy TAG**

Monoacylglycerolová (MAG) dráha začíná acylací MAG. Proces je katalyzován pomocí monoacylglycerol-acyltransferázy (MGAT). Tato dráha převládá v tenkém střevě. Glycerol-3-fosfátová (G-3-P) dráha je dráhou účastníci se de novo syntézy TAG ve většině tkání. G-3-P dráha začíná acylací glycerol-3-fosfátu pomocí glycerol-3-fosfát acyltransferázy (GPAT). Ve výsledku se tvoří lyzofosfatidová kyselina (LPA), která je posléze acylací pomocí LPA acyltransferázy (LPAAT) přeměněna na fosfatidovou kyselinu (PA) a ta defosforylací pomocí PA fosforylázy (PAP) přeměněna na diacylglycerol (DAG). Obě metabolické dráhy sdílí poslední krok přeměny DAG na TAG, který je katalyzován pomocí diacylglycerol-acyltransferázy (DGAT). DAG je také použit jako substrát pro syntézu fosfatidylcholinu (PC) a fosfatidylethanolaminu (PE).

(převzato a upraveno podle (Shi and Cheng 2009))

Byly identifikovány tři izoformy MGAT: MGAT1, MGAT2 a MGAT3, které se liší v lokalizaci v různých tkáních a také se liší svými katalytickými schopnostmi. MGAT3 byl nalezen jenom u vyšších savců a u člověka. MGAT3 sdílí sekvenční homologii a některé katalytické vlastnosti více s DGAT2, než s jinými MGAT formami. To znamená, že MGAT3 pravděpodobně může částečně fungovat jako TAG syntáza (Cao, Cheng et al. 2007).

### ***Hydrolyza cholesterol esterů***

Cholesterol je amfipatická sloučenina steroidní povahy syntetizovaná všemi živočišnými buňkami. Tvoří buněčné membrány, zajišťuje jejich integritu a fluiditu, stabilizuje strukturu membrán, podílí se na mezibuněčné komunikaci a také slouží jako prekurzor pro biosyntézu steroidních hormonů, žlučových kyselin a vitamínu D. Cholesterol je přijímán exogenně z potravy a také vzniká endogenně. Endogenní syntéza probíhá v játrech, ve střevech, nadledvinách a pohlavních orgánech.

Endogenní syntéza cholesterolu začíná po vstupu glukózy do jaterní buňky. Z glukózy se tvoří pyruvát v průběhu glykolýzy. Z pyruvátu se pomocí pyruvátdehydrogenázy (PDH) tvoří acetyl-CoA, ze kterého se sledem reakcí tvoří cholesterol. Cholesterol je v endoplazmatickém retikulu buněk esterifikován acyl-CoA pomocí cholesterol-acyltransferázy (ACAT) za vzniku esterů cholesterolu. Estery cholesterolu jsou spolu s TAG a apolipoproteiny vylučovány z Golgiho aparátu do krevního řečiště jako součásti lipoproteinových komplexů, lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL). V krevním oběhu se VLDL postupně mění na lipoproteiny o střední hustotě (IDL) a potom na lipoproteiny o nízké hustotě (LDL), protože TAG a většina apolipoproteinů jsou z VLDL odstraněny v tukové tkáni a ve vlasečnicích svalů. Přeměnu VLDL na IDL zajišťuje enzym lipoproteinová lipáza (LPL). LPL je exprimována v endoteliálních buňkách v srdci, svalech, tukové tkáni a makrofázích. Enzym zajišťuje hydrolyzu TAG ve VLDL částicích a tím poskytuje mastné kyseliny svalům a adipocytům (Wang and Eckel 2009). IDL se přeměňují na LDL pomocí jaterní lipázy (HL), která hydrolyzuje zbývající TAG. HL je většinou exprimovaná v hepatocytech a v endotelu jater (Connelly 1999).

Periferní tkáně získávají cholesterol z LDL pomocí receptorové endocytózy. Lysozomální lipáza hydrolyzuje estery cholesterolu uvnitř buněk na volný cholesterol. Ten může být zabudován do



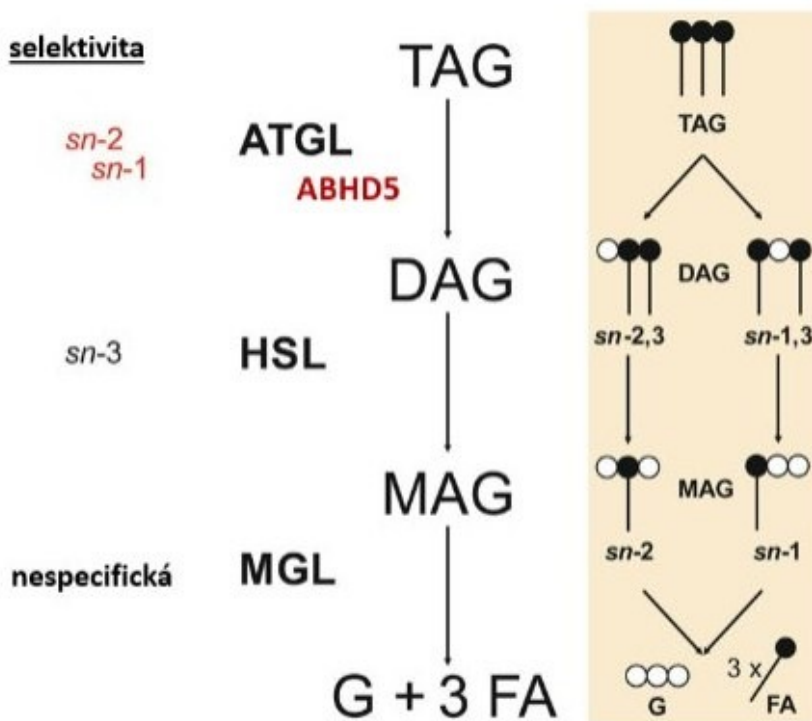
buněčných membrán nebo se reesterifikuje pomocí cholesterol-acyltransferázy a ukládá se ve formě tukových kapének. Na rozdíl od endogenního cholesterolu, exogenní (získaný z potravy) cholesterol je přenášen krví v komplexu s TAG a estery cholesterolu ve formě chylomikronů, které jsou syntetizované ve střevech. Po odstranění TAG je cholesterol receptorovou endocytózou vychytáván jaterními buňkami a periferními tkáněmi. V játrech se přebytečný cholesterol využívá k syntéze žlučových kyselin nebo je esterifikován a vylučován jako součást VLDL do krve (Voet and Voetova 1994).

## **Klíčové enzymy tukové tkáně a jejich genetické modely**

### **Triacylglycerolová lipáza (ATGL)**

Triacylglycerolová lipáza (ATGL), také nazývaná desnutrin, je limitujícím enzymem v hydrolyze TAG. Je vysoce exprimovaná v tukové tkáni, ale také v srdečním svalu, játrech, kosterních svalech, varlately, makrofázích a jiných buněčných typech. ATGL zajišťuje především první krok hydrolyzy TAG na DAG a volnou MK (Zimmermann, Lass et al. 2009). Enzym patří do rodiny proteinů obsahujících tzv. patatinovou doménu. Někteří členové této rodiny vykazují i fosfolipázovou aktivitu. ATGL je kódována genem *Pnpla2* (protein obsahující patatinovou doménu 2), přestože má jen velmi slabou fosfolipázovou aktivitu (Eichmann, Kumari et al. 2012). Pro zajištění dostatečné enzymatické aktivity ATGL vyžaduje koaktivátor 1-acylglycerol-3-fosfát O-acyltransferázu 5 (ABHD5). ABHD5 ve WAT se váže na povrch tukových kapének společně se strukturálním proteinem tukových kapének perilipinem-1 a pak interaguje s ATGL. Vazbou s ABHD5 aktivita ATGL narůstá až 20krát (Zechner 2015). Za bazálních podmínek, tj. nestimulovaných hormony, chrání perilipin tukové kapénky před lipolýzou. Ve stimulovaných buňkách je perilipin fosforylován a usnadňuje degradaci tuku. Fosforylace perilipinu pomocí protein kinázy A (PKA) na serinu 517 je nezbytná pro uvolnění ABHD5 z vazby s perilipinem a pro následnou aktivaci ATGL (Zimmermann, Lass et al. 2009). Byla prokázána substrátová a stereo/regio selektivita ATGL (obr. 3). ATGL selektivně hydrolyzuje TAG v sn-2 pozici na sn-1,3 DAG. Za přítomnosti koaktivátoru ABHD5 jsou TAG hydrolyzované na sn-1,3 a sn-2,3 DAG. ATGL bez účasti ABHD5 je jedinou známou savčí lipázou, která hydrolyzuje TAG selektivně na sn-2 pozici. Je známo, že jenom sn-1,2 DAG je prekurzorem pro syntézu glycerofosfolipidů a také aktivuje různé izoformy protein kinázy C

(PKC). Sn-1,2 DAG je produktem hydrolýzy membránově asociovaného fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu enzymem fosfolipázou C (PLC). Protože v průběhu lipolýzy TAG pomocí ATGL jsou generované sn-1,3 a sn-2,3 DAG, a ne sn-1,2 DAG, je zřejmé, že DAG odvozené z lipolýzy nemají účast v PKC signalizaci (Eichmann, Kumari et al. 2012).



**Obr.3: Stereo/regioselektivita lipolytických enzymů**

TAG je hydrolyzován na sn-1,3 DAG pomocí ATGL nebo na sn-1,3 a sn-2,3 DAG pomocí ATGL s koaktivátorem ABHD5. HSL přednostně hydrolyzuje mastné kyseliny na sn-3 pozici DAG, ve výsledku se tvoří sn-2 a sn-1 MAG. MGL nevykazuje žádnou selektivitu v degradaci MAG na konečný glycerol a tři mastné kyseliny.

(převzato a upraveno podle (Eichmann, Kumari et al. 2012))

Esenciální role ATGL byla prokázána na základě studia myši s vyřazenou funkcí ATGL. Myši, postrádající ATGL, akumulovaly TAG v játrech, kosterních svalech, srdci, varlately, ledvinách a makrofázích a také se u nich rozvíjela obezita, i když byly krmeny standardní dietou s nízkým obsahem tuků. Porušení lipolýzy v důsledku absence ATGL vede ke snížení transkripce genů aktivovaných peroxizomálním proliferátorem aktivovaným receptorem alfa (PPAR $\alpha$ ), které

zajišťují dostatečnou respirační aktivitu mitochondrií. Snížení respirační aktivity vede ke kardiomyopatii a předčasné smrti ATGL-KO myši (Zechner 2015).

Bylo pozorováno, že vyřazení funkce ATGL pouze v BAT mělo vliv na úroveň exprese lipolytických a esterifikačních enzymů v této tkáni, zatímco blokována funkce tohoto enzymu ve WAT nevykazovala výrazné změny v úrovni exprese těchto enzymů. Nicméně tři enzymy, které kompenzovaly nedostatečnost ATGL v BAT, měly i ve WAT zvýšenou expresi (Morak, Schmidinger et al. 2012).

ATGL v  $\beta$ -buňkách pankreatu reguluje inzulínovou sekreci pomocí produkce signálních MAG. Myši se specifickou delecí ATGL v  $\beta$ -buňkách pankreatu, krmené normální dietou, vykazovaly sníženou inzulinémií a sekreci inzulínu stimulovanou glukózou (GSIS). Tento fenotyp byl spojen se zvýšeným výdejem energie a lipidovým metabolismem ve WAT a BAT, což vedlo ke snížení hmotnosti (Attane, Peyot et al. 2016).

Myši, postrádající ABHD5, aktivátor ATGL, měly kromě výše uvedených i další defekty. ABHD5-KO myši mají vážné poškození epidermis v důsledku trans-epidermální ztráty vody. To znamená, že ABHD5 má v kůži a možná i v dalších tkáních další funkci nezávislou na ATGL (Zechner 2015).

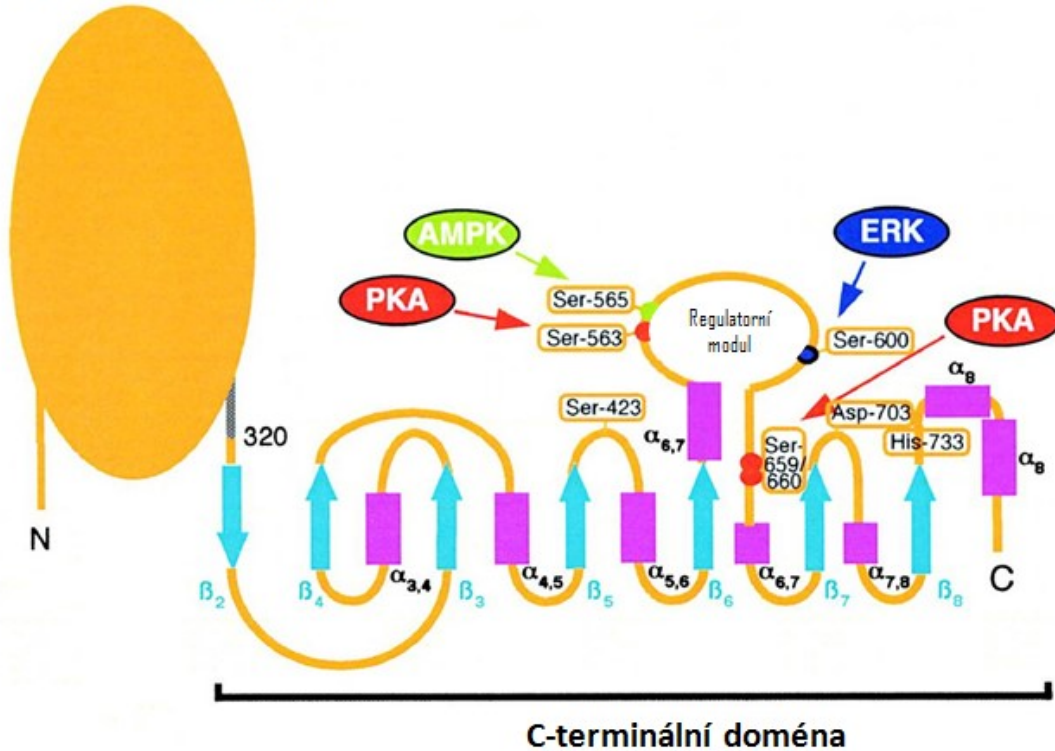
### **Hormon senzitivní lipáza (HSL)**

Hormon senzitivní lipáza (HSL) nebo také cholesterol ester hydroláza (CEH) je vnitrobuněčným enzymem, který má schopnost hydrolýzy různých esterů. Enzym je vysoce exprimován v tukové tkáni, méně je exprimován v srdečním a kosterním svalu a v makrofázích. Aktivita HSL byla poprvé identifikována v tukové tkáni ve spojení s adrenergně aktivovatelnou lipolýzou. Hormony katecholaminy, ACTH a glukagon jsou schopné stimulovat aktivitu HSL (Vaughan, Berger et al. 1964). Enzym existuje v dlouhé a krátké formě. Dlouhá forma je exprimována ve varlatech, kde přeměňuje estery cholesterolu na volný cholesterol pro následnou produkci steroidních hormonů. Krátká forma je exprimována v tukové tkáni, kde hydrolyzuje uložené TAG na volné MK. Pro zjišťování účinků nedostatečné funkce HSL v produkci steroidních hormonů byly izolovány buňky z nadledvin u kontrolních a HSL deficientních myši a následně byla stanovena produkce kortikosteronu *in vitro*. Výsledky ukázaly, že přestože obsah esterů cholesterolu v nadledvinách

byl podstatně zvýšený u HSL deficientních myší, bazální produkce kortikosteronu byla snížena přibližně na 50 %. Aktivita HSL je regulovaná pomocí fosforylace (obr.4). Enzym se aktivuje pomocí cyklické AMP-dependentní protein kinázy (PKA). PKA zvyšuje hydrolytickou aktivitu HSL pomocí fosforylace na serinu v místě, které bylo identifikováno u potkanů jako Ser-563 (Kraemer and Shen 2002). Lipolytické hormony mohou nejenom aktivovat PKA, ale také mitogenem aktivovanou proteinkinázovou (MAPK) dráhu, ve které je extracelulárně regulovaná kináza ERK pomocí fosforylace proteinkinázou MEK (MAP a ERK Kináza). Aktivovaná ERK fosforyluje HSL na Ser-600, čímž také zvyšuje aktivitu HSL (Greenberg, Shen et al. 2001). Enzymy, které inaktivují HSL, jsou fosfatázy. Nejvíce aktivní fosfatázy odstraňující fosforylaci na místě Ser-563 jsou fosfatázy 2A a 2C (Wood, Emmison et al. 1993).

Myši, postrádající HSL v celém těle, vykazovaly mírný fenotyp a samci byly sterilní (Morak, Schmidinger et al. 2012). HSL KO myši, krmené dietou s vysokým obsahem tuku, měly snížený obsah NEFA v krvi a byly rezistentní k obezitě. Tyto myši měly také snížený obsah TAG ve svalech a vykazovaly odolnost k inzulínové rezistenci v kosterním svalstvu a srdci, která byla zapříčiněna dietou (Park, Kim et al. 2005)

## N-terminální doména



*Obr.4: Schematická struktura HSL u potkana*

*N-terminální doména je zobrazena jako globulární struktura, ale její přesná struktura není dosud známa. C-terminální doména je tvořena  $\alpha/\beta$  strukturou, ve které jsou fialovou barvou zobrazené  $\alpha$ -helixy, modrou barvou  $\beta$ -listy. C-terminální doména obsahuje katalytickou triádu: Ser-423, Asp-703, His-733 a také "regulární modul" s důležitými serinovými zbytky, které mohou být fosforylovány pomocí různých zobrazených kináz.*

(převzato a upraveno podle (Kraemer and Shen 2002))

## **$\beta_3$ -adrenoreceptor (ADRB3)**

$\beta_3$ -adrenoreceptor (ADRB3) patří do rodiny receptorů spojených s G-proteiny. Tento receptor hraje důležitou roli v energetickém metabolismu, která zahrnuje zvýšení lipolýzy, mobilizaci volných mastných kyselin z bílé tukové tkáně do cirkulace a termogenezi v hnědé tukové tkáni. ADRB3 je potenciálním cílovým receptorem pro léčbu obezity a diabetu II typu (Zhang and He 2014). Receptory se nacházejí převážně na povrchu bílých a hnědých adipocytů a jsou stimulovány pomocí svých endogenních ligandů katecholaminů - adrenalinem a noradrenalinem. Bylo zjištěno, že receptory se také nacházejí u lidí v srdci, žlučníku, trávicí soustavě, prostatě a

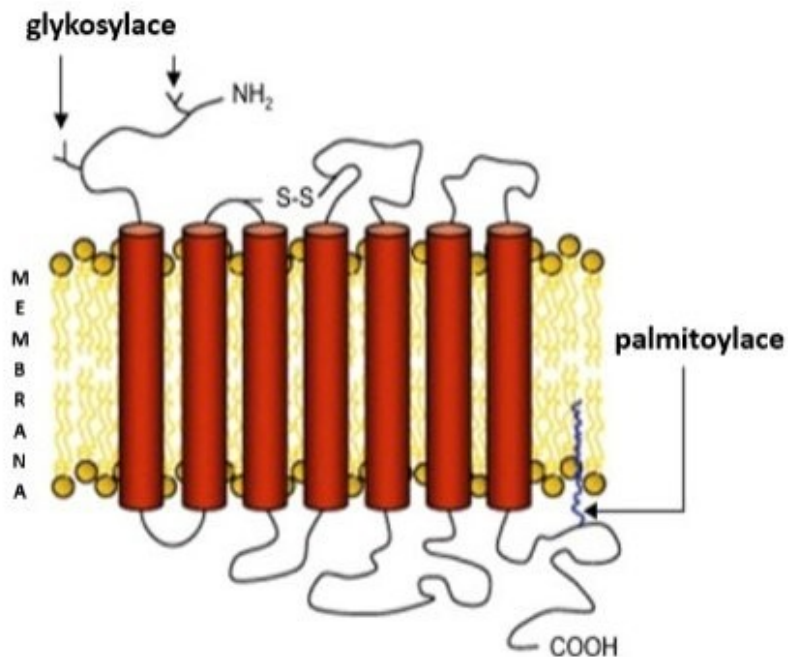
na svěračích močového měchýře. Stimulace  $\beta_3$ -adrenoreceptoru způsobuje různé farmakologické efekty včetně lipolýzy a termogeneze v adipocytech a zároveň snížení motility tlustého střeva a relaxaci svěrače močového měchýře. Někteří  $\beta_3$ -agonisté vykazovali u studovaných živočichů antistresový efekt, což vysvětluje vliv ADRB3 na centrální nervový systém (Sawa and Harada 2006).

Nicméně lokalizace  $\beta_3$ -adrenoreceptorů v BAT neznámá, že tyto receptory vykazují vlastnosti nezbytné pro funkci BAT. Byla prokázána plná funkčnost BAT u morčete, postrádajícího  $\beta_3$ -adrenoreceptory. Podobně byly funkční hnědé adipocyty, připravené z živočichů s odstraněnými geny pro  $\beta_3$ -adrenoreceptory a jejich  $\beta$ -odpověď byla zajištěna pomocí  $\beta_1$ -adrenoreceptorů (Igawa, Aizawa et al. 2010).

Gen, který kóduje  $\beta_3$ -adrenoreceptor, byl klonován u několika druhů: člověka, potkana, myši, hovězího dobytka, opice a psa. Lidské  $\beta_3$ -adrenoreceptory sdílí 51% homologii v pořadí aminokyselin s  $\beta_1$ -adrenoreceptorem a 46% homologii s  $\beta_2$ -adrenoreceptorem. U člověka je gen pro  $\beta_3$ -adrenoreceptor lokalizován na chromozomu 8. Potkaní a lidské  $\beta_3$ -adrenoreceptory jsou ze 79% identické, nejvyšší homologie byla nalezena v transmembránových doménách (94%), zatímco nejnižší homologie byla pozorována v C-terminální části a ve třetí intracelulární smyčce.  $\beta_3$ -, spolu s  $\beta_1$  a  $\beta_2$ -adrenoreceptory patří k receptorům spojených s G-proteiny.  $\beta$ -adrenergní receptory obsahují sedm transmembránových domén s 22 až 28 aminokyselinami a třemi intracelulárními a třemi extracelulárními smyčkami. N-terminální doména receptoru je extracelulární a glykosylovaná, zatímco C-terminální doména je intracelulární. Transmembránové domény TM3, TM4, TM5 a TM6 jsou nezbytné pro vazbu ligandu, zatímco TM2 a TM7 domény jsou zodpovědné za aktivaci  $G_s$ .  $G_s$  je podjednotkou heterotrimerního G-proteinu, který aktivuje c-AMP dependentní dráhu pomocí aktivace adenylyl cyklázy. Disulfidický můstek mezi Cys-110 v druhé a Cys-189 v třetí extracelulární smyčce je nezbytný pro vazbu ligandu a aktivitu receptoru (obr.5) (Igawa, Aizawa et al. 2010).

Myši, postrádající pouze  $\beta_3$ -adrenoreceptory, vykazovaly nepatrné zvýšení tukových zásob. Jinak měly normální fenotyp díky kompenzačnímu zvýšení exprese genu pro  $\beta_1$ -adrenoreceptor v WAT a BAT.  $\beta_3$ -AR KO myši byly rezistentní k  $\beta_3$ -selektivnímu agonistovi CL 316, 243, který

u kontrolních myší zvyšuje lipolýzu, energetický vydej a snižuje příjem potravy (Grujic, Susulic et al. 1997).



**Obr.5: Primární struktura lidského  $\beta_3$ -adrenoreceptoru**

(převzato a upraveno podle (Igawa, Aizawa et al. 2010))

### „ $\beta$ -less“ myši

Na rozdíl od výše popsaných  $\beta_3$ -receptorů,  $\beta_1$ -adrenoreceptory se nacházejí v srdci, jejich stimulace způsobuje zvýšení srdeční frekvence, vedení elektrického impulzu a kontraktility srdečního svalu. Receptory se také nacházejí v juxtaglomerulárních buňkách ledvin a jejich stimulace vede ke zvýšenému výdeji reninu.

$\beta_2$ -adrenoreceptory se nacházejí v srdci a v arteriolách kosterního svalu, koronárních arteriích a játrech. Jejich stimulace způsobuje vazodilataci a zvýšení diastolické relaxace.  $\beta_2$ -

adrenoreceptory také aktivují bronchodilataci a relaxaci močového měchýře (Sniecinski and Levy 2007).

Pro porozumění funkce všech  $\beta$ -adrenoreceptorů v energetickém metabolismu byly vytvořeny „ $\beta$ -less“ myši, postrádající všechny tři typy  $\beta$ -adrenoreceptorů. Bylo pozorováno, že u „ $\beta$ -less“ myši se rozvíjí obezita v průběhu krmení standartní dietou i dietou s vysokým obsahem tuku a také se rozvíjí glukózová intolerance. Bylo dále zjištěno, že tyto myši vykazovaly sníženou GSIS a zvýšení glukoneogeneze v játrech. „ $\beta$ -less“ myši kvůli selhání funkce hnědé tukové tkáně mají nefunkční termogenezi a proto jsou také intolerantní ke chladu (Asensio, Jimenez et al. 2005). Byly také vytvořeny „ $\beta$ -less“ myši, postrádající pouze  $\beta_1$  a  $\beta_3$ -adrenoreceptory. Zatímco  $\beta_1$  a  $\beta_3$ -adrenoreceptory podle některých prací stimulují proliferaci a diferenciaci BAT, nedostatek těchto receptorů u „ $\beta_{1,3}$ -less“ myši nesnižoval množství BAT a neměnil histologický vzhled BAT (Bachman, Dhillon et al. 2002).

Bylo pozorováno, že  $\beta$ -adrenergní receptory se účastní regulace aktivity AMP-aktivované protein kinázy (AMPK). AMPK je enzym, který hraje důležitou roli v regulaci energetické homeostázy v buňce. AMPK aktivuje  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin v játrech a zvyšuje příjem glukózy ve svalech, reguluje lipolýzu v tukové tkáni a inhibuje lipogenezi v tukové tkáni a játrech. Enzym je aktivován fosforylací Thr-172 na jeho alfa podjednotce pomocí stresu a neurohumorálních stimulů. AMPK je regulována alostericky pomocí konkurenční vazby na  $\gamma$  podjednotce mezi ATP a AMP nebo ADP. Vazba ATP umožňuje přístup fosfatázy do Thr-172, zatímco AMP a ADP blokuje její přístup. Enzym je tedy senzorem poměru AMP/ATP nebo ADP/ATP (Winder and Hardie 1999). Pro zjištění účinků AMPK v BAT byla provedena denervace BAT u myši. Šest dnů po denervaci bylo pozorováno snížení množství UCP1 proteinu a aktivity AMPK na 45 %. U „ $\beta$ -less“ myši denervace vedla jen k 25-45 % snížení AMPK aktivity (Pulinilkunnil, He et al. 2011).

### **Diacylglycerol acyltransferázy (DGAT)**

Diacylglycerol acyltransferázy (DGAT) nebo také O-acyltransferázy katalyzují tvorbu TAG z DAG a acyl-CoA. DGAT jsou mikrozomální membránové proteiny, které hrají fundamentální roli v metabolismu buněčného DAG a jsou důležité u vyšších eukaryot pro zajištění fyziologických procesů týkajících se metabolismu TAG včetně střevní absorpce tuku, tvorby



lipoproteinů, formace tukové tkáně a laktace (Cases, Smith et al. 1998). U savců existují dvě izoformy DGAT: DGAT1 a DGAT2. DGAT1 je členem savčí ACAT genové rodiny, zatímco DGAT2 patří k rodině acyltransferáz, které zahrnují také tři MGAT enzymy. DGAT1 je exprimován v tenkém střevě a v tukové tkáni, zatímco DGAT2 je exprimován v játrech, tukové tkáni a kůži (Beyond triglyceride synthesis, Shi, Cheng, 2009). DGAT1 i DGAT2 využívají DAG jako substrát pro syntézu TAG. Enzymy se liší v katalytických vlastnostech, vnitrobuněčné lokalizaci a jejich KO modely se liší ve fenotypických projevech (Shi and Cheng 2009).

DGAT1 a DGAT2 mohou esterifikovat produkty ATGL sn-1,3 a sn-2,3 DAG, ale s různou efektivitou. Protože oba enzymy patří k různým rodinám a nesdílí sekvenční homologii, nemohou se pravděpodobně funkčně navzájem kompenzovat. Bylo pozorováno, že DGAT2 interaguje s tukovými kapénkami a preferuje sn-1,3 DAG jako akceptor acylu. To znamená, že tento enzym může zajišťovat reesterifikaci DAG na TAG v průběhu bazální lipolýzy. Podle různých zdrojů se různě velká část DAG z lipolýzy reesterifikuje zpět do TAG pomocí prázdného metabolického cyklu (Eichmann, Kumari et al. 2012).

DGAT1 je jednou ze čtyř střevních membránově vázaných acyltransferáz, které se účastní absorpce exogenních lipidů. Kromě acylace DAG DGAT1 také vykazuje enzymatickou aktivitu v acylaci MAG. DGAT1 a MGAT3 syntetizují TAG především při nízkých koncentracích 2-MAG. Naopak, při vysokých koncentracích 2-MAG je syntéza TAG snížena. Pro porovnání, množství syntetizovaného TAG pomocí DGAT2 a MGAT2 bylo na podobné úrovni bez závislosti na koncentraci 2-MAG. Analýza DGAT1 KO myši ukázala, že delece DGAT1 způsobila snížení formace chylomikronů. Bylo také zjištěno, že myši s inaktivní DGAT1 mají zvýšenou inzulínovou senzitivitu a jsou chráněny před obezitou v důsledku zvýšeného energetického výdeje. Kromě toho myši, které postrádají adiponektin a které byly krmené dietou s vysokým obsahem tuku, vykazovaly sníženou inzulínovou senzitivitu a zvýšenou akumulaci TAG v játrech než jejich kontroly. Adiponektin je uvolňován z WAT, zvyšuje oxidaci mastných kyselin a zlepšuje inzulínovou senzitivitu. Myši, které postrádají adiponektin i DGAT1, stejně jako DGAT1 deficientní myši, byly chráněny před obezitou, glukózovou intolerancí a jaterní steatózou (Streeper, Koliwad et al. 2006). Tyto výsledky ukázaly, že efekty nedostatku DGAT1 na energetický a glukózový metabolismus jsou nezávislé na adiponektinu. Kromě tohoto efektu

se DGAT1 KO myši akumulovaly tukové kapénky v cytoplazmě enterocytů, pokud byly krmeny dietou s vysokým obsahem tuku. Ale dva další enzymy, DGAT2 a diacylglycerol transacetyláza, zajišťovaly syntézu TAG v myších střevech a tímto způsobem pomáhaly kompenzovat absenci DGAT1. Tyto výsledky naznačují, že DGAT1 není nezbytný pro střevní absorpci TAG nebo syntézu chylomikronů a funkce tohoto enzymu může být kompenzována jinými enzymy s podobnou funkcí, alespoň ve střevě (Buhman, Smith et al. 2002).

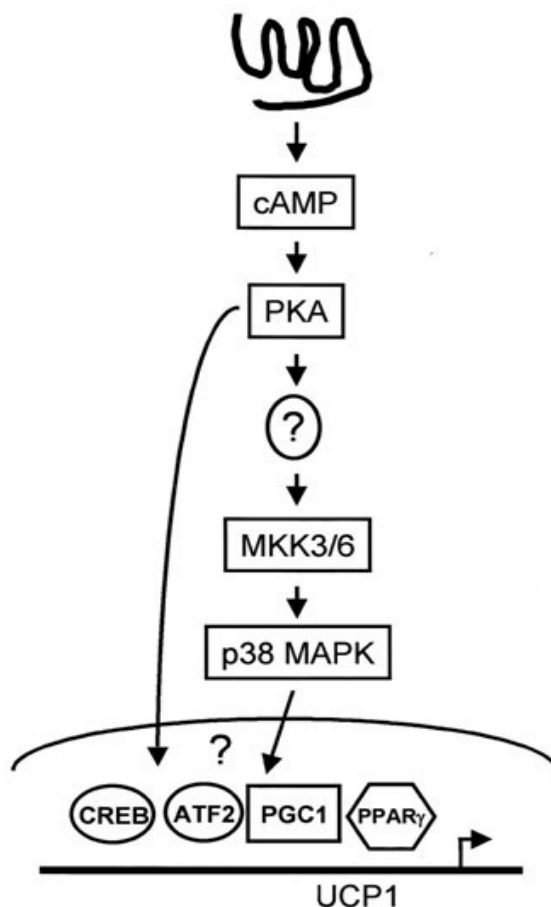
DGAT2 KO myši vykazovaly výrazný fenotyp a nepřežívaly déle než 24 hodin po narození, pravděpodobně díky nedostatečné funkci kožní bariéry (Stone, Myers et al. 2004).

### **Odpřahující protein 1 (UCP1)**

Odpřahující protein 1 (UCP1) nebo také termogenin je transmembránový protein, který je exprimován ve vnitřní mitochondriální membráně BAT. Jeho funkcí je tvorba tepla pomocí netřesové termogeneze. UCP1 snižuje protonový gradient, generovaný v průběhu oxidační fosforylace, pomocí zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány. Zvýšení permeability umožňuje protonům, které byly přečerpány do mezimembránového prostoru, vrátit se do mitochondriální matrix. UCP1 zajišťuje tok protonů, odpřahuje dýchací řetězec od syntézy ATP a umožňuje tak tvorbu tepla. Tok protonů, zprostředkovaný odpřahujícím proteinem, je aktivován pomocí mastných kyselin a inhibován pomocí purinových nukleotidů. Termogenní aktivita UCP1 může být důležitá pro snížení obezity a zvýšení inzulínové senzitivity (Hoang, Smith et al. 2013). Proces termogeneze je kontrolován noradrenalinem. U hnědých adipocytů noradrenalin interaguje se všemi třemi typy adrenergických receptorů a aktivuje různé signální dráhy. Nejdůležitější je dráha  $\beta$ -adrenergní stimulace termogeneze, a to právě přes  $\beta_3$ -adrenoreceptor.

$\beta$ -adrenoreceptory jsou většinou spojené s G-proteiny Gs subtypu. Účinkem noradrenalinu na  $\beta_3$ -adrenoreceptor Gs aktivuje adenylyl cyklázu, která katalyzuje tvorbu cAMP z ATP, cAMP pak aktivuje PKA. PKA dále přenáší signál pomocí fosforylací sérií cílových enzymů (Cannon and Nedergaard 2004). V hnědé tukové tkáni PKA fosforyluje transkripční faktor CREB (cAMP-response-element-binding protein), který aktivuje expresi různých genů včetně genu pro UCP1 (Thonberg, Fredriksson et al. 2002). Exprese UCP1 genu může také být aktivována přes p38 mitogen-aktivovanou protein kinázovou dráhu (MAP kinázovou dráhu). Aktivace všech  $\beta$ -

adrenoreceptorů stimuluje produkci cAMP a aktivuje PKA. Není dosud jasné, jakým způsobem je propojená signalizace mezi PKA a kinázami mitogen aktivovaných protein kináz (MKK). MKK fosforylují p38 MAPK, která posléze může fosforylovat několik transkripčních faktorů, což vede ke zvýšení genové exprese UCP1 (obr.6) (Cao, Medvedev et al. 2001). Signalizační dráhy týkající se regulace exprese UCP1 v BAT jsou v současné době podrobeny intenzivnímu výzkumu.

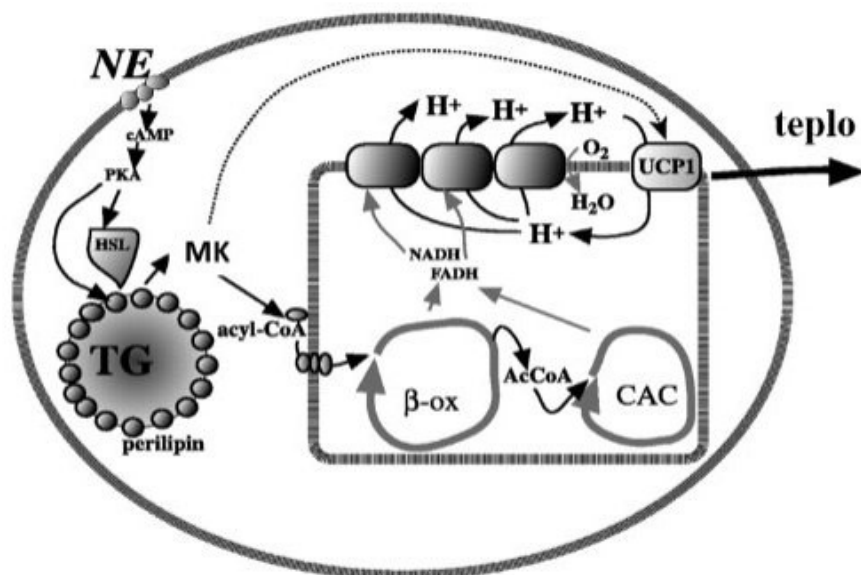


**Obr.6: Navrhovaný model metabolické dráhy pro aktivaci UCP1 genu přes  $\beta$ -adrenoreceptor pomocí PKA a p38 MAPK**

(převzato a upraveno podle (Cao, Medvedev et al. 2001))

PKA také fosforyluje cytosolické proteiny. Centrální dráhou pro kontrolu netřesové termogeneze v BAT je lipolytická dráha (obr.7). Pro iniciaci termogeneze je potřebná aktivace lipolýzy v hnědých adipocytech. Stimulace lipolýzy se skládá z aktivace hormon-senzitivní lipázy a

fosforylace perilipinu. Perilipin je protein, který chrání TAG před aktivitou HSL. Aktivovaná PKA fosforyluje perilipin, a tím ho inaktivuje. Fosforylovaný perilipin se disociuje od tukových kapének a tím umožňuje přístup pro HSL. Jako výsledek noradrenalinem- indukované lipolýzy se pomocí HSL tvoří volné mastné kyseliny, které fungují jako termogenní substráty. Volné mastné kyseliny v hnědých adipocytech jsou také přenášeny do matrix mitochondrie jako u jiných buněk pomocí CPT1-CACT-CPT2 transportního systému. V matrix mitochondrií volné mastné kyseliny vstupují do  $\beta$ -oxidace. Uvolněný acetyl-CoA následně vstupuje do Krebsova cyklu a je oxidován. Elektrony z flavinových a pyridinových koenzymů se přenáší soustavou přenašečů na vnitřní mitochondriální membráně a tím zajišťují energii k tvorbě elektrochemického protonového gradientu. Komplexy dýchacího řetězce pumpují vodíkové kationty z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru. To znamená, že funkce mitochondrií hnědých adipocytů na rozdíl od bílých adipocytů se liší jen v termogenní schopnosti UCP1 proteinu (Cannon and Nedergaard 2004).



**Obr. 7: Noradrenalinem indukovaná stimulace termogeneze v hnědých adipocytech**

*Uvolněné mastné kyseliny z tukových kapének účinkem HSL vstupují do mitochondrií ve formě acyl-CoA. Nasledující  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a aktivita citrátového cyklu (CAC) vede k formaci redukováných přenašečů elektronů FADH a NADH, které jsou posléze oxidované pomocí elektron-transportního řetězce. Ve výsledku se tvoří protonový gradient díky pumpování vodíkových kationtů pomocí komplexů dýchacího řetězce z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru. Proton-motivní síla vrací protony zpět do matrix mitochondrie pomocí odpráhujícího proteinu UCP1. Energie, uložená v proton-motivní síle, je pak uvolněná ve formě tepla.*

(převzato a upraveno podle (Cannon and Nedergaard 2004))

Adipocytový protein 2 (aP2) patří k rodině proteinů vázajících mastné kyseliny (FABP) a je primárně exprimován v adipocytech a makrofázích. FABP jsou intracelulárními lipidovými proteiny, které usnadňují transport mastných kyselin do mitochondrií nebo peroxizomů určených k oxidaci, regulují transkripci v jádře, signalizaci, pohyb váčků a syntézu membrán v endoplazmatickém retikulu (ER), enzymatickou aktivitu a skladování tukových kapének v cytoplazmě. Bylo prokázáno, že aP2 aktivuje HSL v adipocytech a tím reguluje lipolýzu. Myši, postrádající aP2 vykazovaly zvýšení hmotnosti a zároveň snížení inzulínové rezistence (Furuhashi, Saitoh et al. 2014).

Bylo prokázáno, že lipolytický efekt noradrenalinu byl snížen v bílých adipocytech transgenních myši s expresí UCP1 genu pod  $\alpha$ P2 promotorem (Flachs, Novotny et al. 2002). Transgenní myši se zvýšenou expresí UCP1 genu pod  $\alpha$ P2 promotorem ( $\alpha$ P2-Ucp1) byly odolné vůči obezitě a vykazovaly nižší akumulaci TAG ve všech tukových depech kromě gonadálního. U  $\alpha$ P2-UCP1 myši bylo pozorováno snížení ATP/ADP poměru a cAMP hladiny po stimulu noradrenalinem. Transgenní UCP1 také ovlivňuje expresi trimerních G-proteinů v adipocytech zvýšením obsahu aktivačních  $\alpha$ -podjednotek G-proteinů a snížením obsahu inhibičních  $\alpha$ -podjednotek (Flachs, Novotny et al. 2002)

Pro potvrzení vztahu mezi termogenezí a příjmem glukózy, způsobeným  $\beta_3$ -adrenergní stimulací, byly porovnávány  $\alpha$  UCP1-KO myši a jejich kontroly, postrádající schopnost netřesové termogeneze. Pro stimulaci příjmu glukózy byl použit  $\beta_3$ -adrenergní agonista CL-316, 243. Výsledek obou experimentů byl stejný: příjem glukózy, zprostředkovaný  $\beta_3$ -adrenergní stimulací byl nezávislý na aktivitě UCP1. Výzkum hnědých adipocytů u těchto myších modelů ukázal, že  $\beta$ -adrenergní stimulace vede k příjmu glukózy buňkou prostřednictvím syntézy transportéru glukózy GLUT1 a následnou translokaci GLUT1 na plazmatickou membránu. U lidských hnědých adipocytů tento model fungoval stejně. Signální dráha, regulující translokaci GLUT1, zahrnuje mTOR, konkrétně mTORC2. mTOR je katalytickou podjednotkou dvou strukturně odlišných komplexů: mTORC1 a mTORC2. mTOR působí jako serin/threoninová protein kináza a je centrálním regulátorem savčího metabolismu v játrech, svalech, WAT, BAT a mozku (Olsen, Csikasz et al. 2017).

## **Závěr**

Předložená práce vysvětluje důležitost metabolismu tukové tkáně pro celý organismus. Souhra procesů lipolýzy a lipogeneze na jednu stranu zabezpečuje dostatek energie pro všechny orgány a tkáně a na druhou stranu zajišťuje ukládání přebytečného tuku do zásob.

Obezita je stav, kdy ukládání tuku do zásob stoupá nad obvyklou úroveň a má negativní vliv na zdraví. Všeobecné příčiny obezity jsou nadbytečný příjem potravy, nedostatek fyzické aktivity a genetická náchylnost. Obezita je dnes jedním s nejrozšířenějších rizikových faktorů mortality a je spojená s metabolickým syndromem, kardiovaskulárními poruchami a diabetem 2 typu.

Studium metabolismu tukové tkáně, signálních drah a regulace UCP1 proteinu pomocí genetických manipulací nebo farmakologických preparátů je důležitým předpokladem pro identifikaci nových léčiv zvyšujících inzulínovou sensitivitu a pro léčbu obezity.

## Seznam použité literatury

- Asensio, C., M. Jimenez, F. Kuhne, F. Rohner-Jeanrenaud and P. Muzzin (2005). "The lack of beta-adrenoceptors results in enhanced insulin sensitivity in mice exhibiting increased adiposity and glucose intolerance." Diabetes **54**(12): 3490-3495.
- Attane, C., M. L. Peyot, R. Lussier, P. Poursharifi, S. Zhao, D. Zhang, J. Morin, M. Pineda, S. Wang, O. Dumortier, N. B. Ruderman, G. A. Mitchell, B. Simons, S. R. Madiraju, E. Joly and M. Prentki (2016). "A beta cell ATGL-lipolysis/adipose tissue axis controls energy homeostasis and body weight via insulin secretion in mice." Diabetologia **59**(12): 2654-2663.
- Bachman, E. S., H. Dhillon, C. Y. Zhang, S. Cinti, A. C. Bianco, B. K. Kobilka and B. B. Lowell (2002). "betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance." Science **297**(5582): 843-845.
- Berry, D. C., D. Stenesen, D. Zeve and J. M. Graff (2013). "The developmental origins of adipose tissue." Development **140**(19): 3939-3949.
- Buhman, K. K., S. J. Smith, S. J. Stone, J. J. Repa, J. S. Wong, F. F. Knapp, Jr., B. J. Burri, R. L. Hamilton, N. A. Abumrad and R. V. Farese, Jr. (2002). "DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis." J Biol Chem **277**(28): 25474-25479.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." Physiol Rev. **84**(1): 277-359.
- Cao, J., L. Cheng and Y. Shi (2007). "Catalytic properties of MGAT3, a putative triacylglycerol synthase." J Lipid Res **48**(3): 583-591.
- Cao, W., A. V. Medvedev, K. W. Daniel and S. Collins (2001). "beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase." J Biol Chem **276**(29): 27077-27082.
- Cases, S., S. J. Smith, Y. W. Zheng, H. M. Myers, S. R. Lear, E. Sande, S. Novak, C. Collins, C. B. Welch, A. J. Lusis, S. K. Erickson and R. V. Farese, Jr. (1998). "Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13018-13023.
- Cheng, D., J. Iqbal, J. Devenny, C. H. Chu, L. Chen, J. Dong, R. Seethala, W. J. Keim, A. V. Azzara, R. M. Lawrence, M. A. Pelleymounter and M. M. Hussain (2008). "Acylation of acylglycerols by acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). Functional importance of DGAT1 in the intestinal fat absorption." J Biol Chem **283**(44): 29802-29811.
- Connelly, P. W. (1999). "The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism." Clin Chim Acta **286**(1-2): 243-255.



- Eichmann, T. O., M. Kumari, J. T. Haas, R. V. Farese, Jr., R. Zimmermann, A. Lass and R. Zechner (2012). "Studies on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-O-acyltransferases." J Biol Chem **287**(49): 41446-41457.
- Flachs, P., J. Novotny, F. Baumruk, K. Bardova, L. Bourova, I. Miksik, J. Sponarova, P. Svoboda and J. Kopecky (2002). "Impaired noradrenaline-induced lipolysis in white fat of aP2-Ucp1 transgenic mice is associated with changes in G-protein levels." Biochemical Journal **364**(Pt 2): 369-376.
- Furuhashi, M., S. Saitoh, K. Shimamoto and T. Miura (2014). "Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases." Clinical Medicine Insights: Cardiology.
- Greenberg, A. S., W. J. Shen, K. Muliro, S. Patel, S. C. Souza, R. A. Roth and F. B. Kraemer (2001). "Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway." J Biol Chem **276**(48): 45456-45461.
- Grujic, D., V. S. Susulic, M. E. Harper, J. Himms-Hagen, B. A. Cunningham, B. C. Corkey and B. B. Lowell (1997). "Beta3-adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate beta3-selective agonist-induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake." Journal of Biological Chemistry **272**: 17686-17693.
- Hoang, T., M. D. Smith and M. Jelokhani-Niaraki (2013). "Expression, folding, and proton transport activity of human uncoupling protein-1 (UCP1) in lipid membranes: evidence for associated functional forms." J Biol Chem **288**(51): 36244-36258.
- Holm, C., T. Osterlund, H. Laurell and J. A. Contreras (2000). "Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis [In Process Citation]." Annu.Rev.Nutr. **20**: 365-393.
- Igawa, Y., N. Aizawa and Y. Homma (2010). "Beta3-adrenoceptor agonists: possible role in the treatment of overactive bladder." Korean J Urol **51**(12): 811-818.
- Kraemer, F. B. and W. J. Shen (2002). "Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis." J Lipid Res **43**(10): 1585-1594.
- Lara-Castro, C. and W. T. Garvey (2008). "Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome." Endocrinol Metab Clin North Am **37**(4): 841-856.
- Morak, M., H. Schmidinger, G. Riesenhuber, G. N. Rechberger, M. Kollroser, G. Haemmerle, R. Zechner, F. Kronenberg and A. Hermetter (2012). "Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) deficiencies affect expression of lipolytic activities in mouse adipose tissues." Mol Cell Proteomics **11**(12): 1777-1789.

Olsen, J. M., R. I. Csikasz, N. Dehvari, L. Lu, A. Sandström, A. I. Öberg, J. Nedergaard, S. Stone-Elander and T. Bengtsson (2017). " $\beta$  3 -adrenergically induced glucose uptake in brown adipose tissue is independent of UCP1 presence or activity: Mediation through the mTOR pathway." Molecular Metabolism.

Park, S. Y., H. J. Kim, S. Wang, T. Higashimori, J. Dong, Y. J. Kim, G. Cline, H. Li, M. Prentki, G. I. Shulman, G. A. Mitchell and J. K. Kim (2005). "Hormone-sensitive lipase knockout mice have increased hepatic insulin sensitivity and are protected from short-term diet-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart." Am J Physiol Endocrinol.Metab **289**(1): E30-E39.

Pulinilkunnil, T., H. He, D. Kong, K. Asakura, O. D. Peroni, A. Lee and B. B. Kahn (2011). "Adrenergic regulation of AMP-activated protein kinase in BAT in vivo." Journal of Biological Chemistry.

Sawa, M. and H. Harada (2006). "Recent developments in the design of orally bioavailable beta3-adrenergic receptor agonists." Curr Med Chem **13**(1): 25-37.

Shi, Y. and D. Cheng (2009). "Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(1): E10-18.

Smorlesi, A., A. Frontini, A. Giordano and S. Cinti (2012). "The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation." Obes.Rev. **13 Suppl 2**: 83-96.

Sniecinski, R. and J. Levy (2007). "Cardiovascular Pharmacology."

Stone, S. J., H. M. Myers, S. M. Watkins, B. E. Brown, K. R. Feingold, P. M. Elias and R. V. Farese, Jr. (2004). "Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice." J Biol Chem **279**(12): 11767-11776.

Streeper, R. S., S. K. Koliwad, C. J. Villanueva and R. V. Farese, Jr. (2006). "Effects of DGAT1 deficiency on energy and glucose metabolism are independent of adiponectin." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(2): E388-394.

Thonberg, H., J. M. Fredriksson, J. Nedergaard and B. Cannon (2002). "A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation." Biochem J **364**(Pt 1): 73-79.

Vaughan, M., J. E. Berger and D. Steinberg (1964). "Hormone-Sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue." J Biol Chem **239**: 401-409.

Viscarra, J. A. and R. M. Ortiz (2013). "Cellular mechanisms regulating fuel metabolism in mammals: Role of adipose tissue and lipids during prolonged food deprivation." Metabolism.

Vitali, A., I. Murano, M. C. Zingaretti, A. Frontini, D. Ricquier and S. Cinti (2012). "The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes." J Lipid Res **53**(4): 619-629.

Voet, D. and J. G. Voetova (1994). Biochemie2. Praha, Victoria Publishing.

Wang, H. and R. H. Eckel (2009). "Lipoprotein lipase: from gene to obesity." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(2): E271-288.

Winder, W. W. and D. G. Hardie (1999). "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes." Am.J.Physiol **277**(1 Pt 1): E1-10.

Wood, S. L., N. Emmison, A. C. Borthwick and S. J. Yeaman (1993). "The protein phosphatases responsible for dephosphorylation of hormone-sensitive lipase in isolated rat adipocytes." Biochem J **295** ( Pt 2): 531-535.

Yang, X., X. Zhang, B. L. Heckmann, X. Lu and J. Liu (2011). "Relative contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced lipolysis in adipocytes." J Biol Chem **286**(47): 40477-40485.

Zechner, R. (2015). "FAT FLUX: enzymes, regulators, and pathophysiology of intracellular lipolysis." EMBO Mol Med **7**(4): 359-362.

Zhang, F., G. Hao, M. Shao, K. Nham, Y. An, Q. Wang, Y. Zhu, C. M. Kusminski, G. Hassan, R. K. Gupta, Q. Zhai, X. Sun, P. E. Scherer and O. K. Oz (2018). "An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents." Cell Metab **27**(1): 252-262 e253.

Zhang, W. and Y. He (2014). Handbook of pharmacogenomics and stratified medicine.

Zimmermann, R., A. Lass, G. Haemmerle and R. Zechner (2009). "Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis." Biochim Biophys Acta **1791**(6): 494-500.