

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Natálie Fikarová**

Úloha odpráhujícího proteinu UCP2 v buňkách imunitního systému

Role of uncoupling protein UCP2 in immune cells

Bakalářská práce

Školitelka: doc. RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2021

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat své školitelce doc. RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. nejenom za její odborné vedení a pomoc při psaní závěrečné práce, ale i za její velikou vstřícnost a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat všem z Laboratoře imunoregulací za jejich cenné rady a v neposlední řadě své rodině za podporu při psaní práce.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a veškerou literaturu spolu s ostatními informačními zdroji řádně ocitovala. Tato závěrečná práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 26.04.2021

Podpis:

## Abstrakt

UCP2 je jedním ze čtyř objevených homologů dobře známého odpráhujiícího proteinu UCP1, který se uplatňuje při netřesové termogenezi. Na rozdíl od UCP1 je tento konkrétní homolog ubikvitně exprimován v řadě tkání, kde mimo odprážení plní i další řadu funkcí jako transport iontů a metabolitů. Tato práce charakterizuje UCP2 a zaměřuje se především na jeho aktivitu v jednotlivých typech buněk vrozené i adaptivní imunity. V závěru práce je shrnuta role UCP2 v některých onemocněních jako je diabetes mellitus 1. typu, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a ulcerózní kolitida s důrazem na možné využití tohoto proteinu při jejich léčbě.

**Klíčová slova:** imunitní buňky, odpráhujiící proteiny, UCP2

## Abstract

UCP2 is one of four discovered homologues of a well-known uncoupling protein UCP1 implicated in non-shivering thermogenesis. In contrast to UCP1, this particular homologue is ubiquitously expressed in many human tissues, where it performs a broader range of functions including uncoupling and specific transport of ions and metabolites. This work characterises UCP2, focusing on its activity in the cells of innate and adaptive immunity. To conclude, this work summarises the role of UCP2 in several diseases, such as Type 1 diabetes mellitus, Alzheimer's and Parkinson's disease and ulcerative colitis. Emphasis is put on the possible utilisation of this protein in the treatment of the above-mentioned diseases.

**Keywords:** immune cells, uncoupling proteins, UCP2

# Obsah

## Seznam použitých zkratek

1	Úvod .....	1
2	Odpřahující proteiny.....	2
2.1	UCP1 .....	2
2.2	UCP2 .....	3
2.3	UCP3, UCP4 a UCP5 .....	6
3	Regulace UCP2 .....	6
3.1	Purinové nukleotidy.....	7
3.2	Mastné kyseliny.....	7
3.3	Glutamin.....	8
4	UCP2 v imunitních buňkách .....	9
4.1	Role UCP2 v makrofázích.....	9
4.1.1	Schopnost fagocytózy .....	9
4.1.2	Produkce ROS.....	10
4.1.3	Produkce cytokinů a NO.....	11
4.1.4	Schopnost migrace.....	13
4.2	Role UCP2 v dalších typech buněk vrozené imunity .....	13
4.3	Role UCP2 v T lymfocytech .....	14
4.3.1	Produkce ROS.....	14
4.3.2	Metabolismus buňky.....	15
4.3.3	Proliferace a diferenciací buňky.....	15
4.4	Role UCP2 v B lymfocytech .....	16
5	Role UCP2 ve vybraných onemocněních .....	17
5.1	Diabetes mellitus 1. typu .....	17
5.2	Alzheimerova a Parkinsonova choroba .....	19
5.3	Ulcerózní kolitida .....	20
6	Závěr.....	21
7	Použité zdroje .....	22

## Seznam použitých zkratek

<b>ADP</b>	adenosine diphosphate, adenosin difosfát
<b>ATP</b>	adenosine triphosphate, adenosin trifosfát
<b>ANT</b>	adenine nucleotide translocator, adenin nukleotid translokáza
<b>BAT</b>	brown adipose tissue, hnědá tuková tkáň
<b>CD</b>	cluster of differentiation, diferenciační skupina
<b>CNS</b>	central nervous system, centrální nervová soustava
<b>ETC</b>	electron transport chain, elektron-transportní řetězec
<b>FA</b>	fatty acids, mastné kyseliny
<b>GDP</b>	guanosine diphosphate, guanosin difosfát
<b>GTP</b>	guanosine triphosphate, guanosin trifosfát
<b>IgG</b>	immunoglobulin G, imunoglobulin G
<b>IL</b>	interleukin, interleukin
<b>IMM</b>	inner mitochondrial membrane, vnitřní mitochondriální membrána
<b>IMS</b>	intermembrane space, mezimembránový prostor
<b>iPLA<sub>2</sub><math>\gamma</math></b>	calcium-independent phospholipase A <sub>2</sub> - $\gamma$ , na vápníku nezávislá mitochondriální fosfolipáza A <sub>2</sub> $\gamma$
<b>LPS</b>	lipopolysaccharide, lipopolysacharid
<b>MAPK</b>	mitogen activated protein kinase, mitogenem aktivovaná protein kináza
<b>NFAT</b>	nuclear factor of activated T-cells, jaderný faktor aktivovaných T buněk
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, jaderný transkripční faktor kappa B buněk
<b>NO</b>	nitric oxide, oxid dusnatý
<b>ORF</b>	open reading frame, otevřený čtecí rámec
<b>ROS</b>	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
<b>TCR</b>	T cell receptor, T-buněčný receptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor $\alpha$ , tumor nekrotizující faktor $\alpha$
<b>T1DM</b>	type 1 diabetes mellitus, diabetes mellitus 1. typu
<b>UCP</b>	uncoupling protein, odpráhující protein

# 1 Úvod

Mitochondrie je často označována pojmem „powerhouse of the cell“ (volně přeloženo jako „buněčná elektrárna“). Toto označení poukazuje na skutečnost, že je v ní pomocí  $F_0F_1$ -ATP syntázy vyprodukováno velké množství adenosin trifosfátu (adenosine triphosphate - ATP), které pro buňku představuje univerzální zdroj energie. V mitochondriích se  $F_0F_1$ -ATP syntáza nachází na vnitřní mitochondriální membráně (inner mitochondrial membrane – IMM). K syntéze ATP je nezbytný elektrochemický gradient, aby za využití protonů přecházejících z mezimembránového prostoru (intermembrane space – IMS) do mitochondriální matrix mohlo dojít k syntéze ATP z adenosin difosfátu (ADP) a anorganického fosfátu. Protonmotivní síla je na IMM vytvářena činností elektron-transportního řetězce (electron transport chain – ETC), konkrétně pak komplexy I, III a IV za současné reoxidace koenzymů. Protony jsou za pomoci ETC přemístěny z matrix do IMS a jejich zpětný průchod je následně spřažen s tvorbou ATP katalyzovanou  $F_0F_1$ -ATP syntázou (shrnutí v: Song et al., 2018).

„Uncoupling“ je označením pro proces, při kterém dochází k odprášení zpětného průchodu protonů a syntézy ATP. Je regulován přítomností odpráhuječích proteinů (uncoupling protein – UCP) v IMM. Tyto proteiny umožňují průchod  $H^+$  iontů z IMS do mitochondriální matrix, aniž by byly využité ATP syntázou, a tak nedochází k plnému využití protonů k tvorbě ATP (shrnutí v: Rousset et al., 2004). V současnosti je popsána řada UCP. Nejznámějším z nich je UCP1, též termogenin, uplatňující se při netřesové termogenezi v hnědé tukové tkáni (brown adipose tissue – BAT) (Nicholls et al., 1978). Výzkum se však v posledních letech rapidně vyvíjí. Ukazuje se, že funkce nově objevených odpráhuječích proteinů UCP2 - UCP5 je daleko širší. Všechny tyto proteiny jsou v dnešní době intenzivně studovány, zejména pak UCP2, který je úzce spojován s alternacemi v oxidativním metabolismu buňky a modifikacemi v aktivitě imunitních buněk (Rupprecht et al., 2012).

Práce si klade za cíl shrnout poznatky o funkci odpráhuječícího proteinu UCP2, a to především ve spojitosti s buňkami imunitního systému, u kterých prokazatelně ovlivňuje jejich aktivitu (Arsenijevic et al., 2000). V dnešní době probíhají studie možného využití UCP2 při terapii u řady autoimunitních, metabolických i neurodegenerativních onemocněních (shrnutí v: Chen et al., 2018; Kaplan and Ng, 2017; Kempuraj et al., 2017). V závěrečné části práce bude shrnuta role UCP2 ve výše uvedených onemocněních.

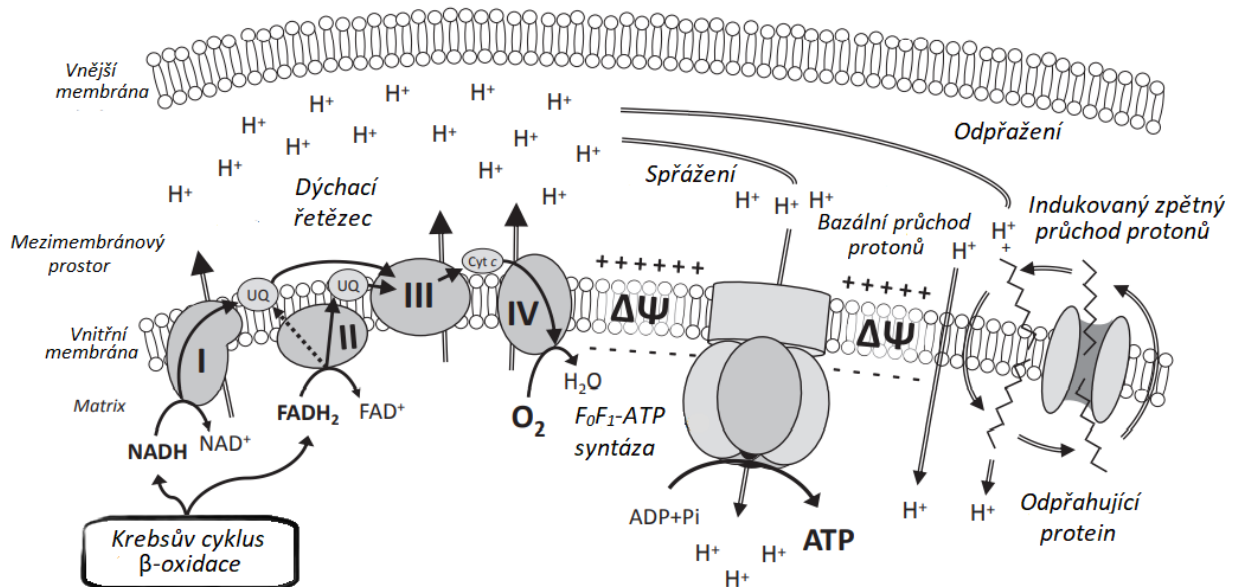
## 2 Odpřahující proteiny

Až téměř do konce 90. let 20. století nebyl znám jiný odpřahující protein než termogenin (Nicholls et al., 1978). Postupně pak od roku 1997 došlo k objevům několika dalších proteinů, které byly díky jejich sekvenční podobnosti k termogenu také označeny za odpřahující proteiny. Byla jim přiřazena čísla pro vzájemné odlišení, a to konkrétně UCP2 (Fleury et al., 1997), UCP3 (Boss et al., 1997), UCP4 (Mao et al., 1999) a UCP5 (Sanchis et al., 1998) pro lidské proteiny. Navíc byly identifikovány i analogy odpřahujících proteinů v ostatních organismech jako například u ptáků avUCP (Raimbault et al., 2001) či u rostlin pUCP (Vercesi et al., 1995). Z důvodu přehlednosti byl tedy termogenin v době objevu zbylých UCP přejmenován na UCP1 pro jeho historické prvenství v této rodině.

### 2.1 UCP1

Klasicky byl UCP1 nejvíce spojován s BAT. UCP1 zde hraje klíčovou roli při netřesové termogenezi, podle které bylo původně odvozeno samotné jméno proteinu, termogenin. Netřesová termogeneze se uplatňuje například u lidských novorozenců (Dawkins and Scopes, 1965) či hibernujících savců (Scantlebury et al., 2008). Novější výzkumy ukazují, že se UCP1 exprimuje i v bílé tukové tkáni. Najdeme ho například v tukové tkáni epikardu (Chechi et al., 2017) či renální tukové tkáni (Li et al., 2019) a jeho role zde by mohla být poměrně široká, i když ještě ne zcela prozkoumaná. V BAT plní UCP1 svou funkci odpřažením průchodu protonů z IMS do mitochondriální matrix od syntézy ATP (viz. Obrázek 1). Procesem průchodu  $H^+$  iontů skrz protein se generuje teplo namísto produkce ATP. Celý proces je pod kontrolou sympatického nervového systému (sympatikus) a jím kontrolované sekrece noradrenalinu, který po navázání na  $\beta$ -adrenergní receptory v buňce spouští kaskádu reakcí vedoucích ke zvýšené lipolýze poskytující volné mastné kyseliny (fatty acids – FA) (shrnutí v: Himms-Hagen, 1990). O FA se dlouhá léta mluvilo jako o aktivátorech nebo kofaktorech UCP1. Nebyly však známy přesné mechanismy vlivu FA na UCP1 a existovalo hned několik modelů navrhuujících různé cesty aktivace (shrnutí v: Nedergaard et al., 2001). V současnosti je ale již poměrně jisté, že FA stimulují aktivitu UCP1, čímž dochází ke generování tepla v BAT (Winkler and Klingenberg, 1994). Jelikož je nutné aktivitu UCP1 indukovat, hovoříme o tzv. indukovaném protonovém průchodu.

Pro stimulaci sympatiku vedoucí k následné aktivaci UCP1 slouží zejména chlad a dieta bohatá na tuky (shrnuto v: Nedergaard et al., 2001). Autoři článku zde však poukazují na fakt, že u proteinů UCP2 a UCP3 je indukce odlišná.



Obrázek 1 - Odpřažení zpětného průchodu protonů: Na obrázku jsou znázorněny komplexy dýchacího řetězce (označené římskými číslicemi I – IV). Činností komplexů I, III a IV se protony dostávají do mezimembránového prostoru. Zpětný průchod těchto protonů do mitochondriální matrix je následně využit k syntéze ATP katalyzované F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP syntázou (spřážení). Ne všechny protony jsou ale efektivně využity, některé mohou přes membránu procházet procesem bazálního či indukovaného průchodu. K bazálnímu průchodu protonů dochází spontánně důsledkem defektů ve vnitřní mitochondriální membráně snižující membránový potenciál. Indukovaný průchod protonů je zprostředkován odpřahujícími proteiny. V případě odpřahujícího proteinu 1 dochází při tomto procesu k produkci tepla v rámci netřesové termogenezi. Zkratky: ADP+Pi (adenosin difosfát + anorganický fosfát), ATP (adenosin trifosfát), cyt c (cytochrom c), FAD (oxidovaná forma flavinadenindinukleotidu), FADH<sub>2</sub> (redukováná forma flavinadenindinukleotidu), NAD (oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu), NADH (redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidu), UQ (ubichinon). Převzato a upraveno: (shrnuto v: Kikusato et al., 2016).

## 2.2 UCP2

UCP2 je, jak již bylo zmíněno, druhým objeveným odpřahujícím proteinem. Jeho objev odstartoval vlnu nového poznání a výzkum dalších UCP. Sekvence lidského UCP2 je z 59 % identická sekvenci UCP1 a mezi myším a lidským homologem proteinu je 95% identita (Fleury et al., 1997). Významnou homologii s UCP1 vykazovaly zejména motivy pro mitochondriální přenašeče a vazbu ATP, což nasvědčovalo obdobné roli jako má UCP1 v BAT. A opravdu byla schopnost odpřažení u UCP2 částečně prokázána. Nicméně zajímavý byl jeho výskyt. Ve srovnání s UCP1 byla UCP2 mRNA detekována v mnohem větším počtu tkání.

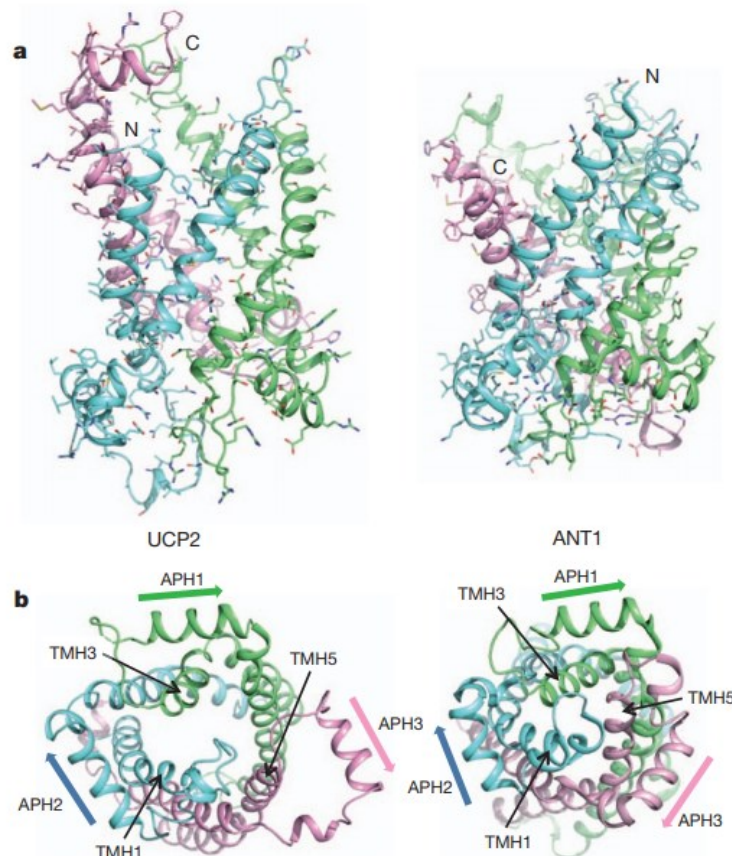


U myšího modelu to bylo hlavně v tukové tkáni, srdci a ledvinách. U lidí pak ve slezině, thymu, leukocytech, makrofázích, kostní dřeni a žaludku, z čehož autoři odvodili možné zapojení UCP2 při imunitní odpovědi (Fleury et al., 1997). Této úvaze ale bohužel nevěnovali další pozornost. Ta byla přeměřována k roli UCP2 při obezitě a termoregulaci. Toto by se dalo považovat za jistý trend přetrvávající pár let po objevení dalších UCP. Jelikož byly přiřazeny do stejné rodiny proteinů jako termogenin, předpokládalo se, že jejich hlavní funkcí bude právě generování tepla při netřesové termogenezi. Bylo složité si představit, že protein tak sekvenčně podobný UCP1 by mohl sloužit jinému účelu.

Od začátku tedy bylo známo, že je UCP2 exprimován také v orgánech, které mají co do činění s imunitními buňkami. Výzkum se rozběhl i tímto směrem a od vztahu UCP2 k termogenezi se postupně upouštělo. UCP2 byl označen za negativní regulátor produkce reaktivních kyslíkových forem (reactive oxygen species – ROS) v makrofázích ovlivňující imunitní odpověď při infekci *Toxoplasma gondii*. Makrofágy *UCP2<sup>-/-</sup>* myši více odolávaly infekci tímto parazitem (Arsenijevic et al., 2000). Makrofágy byly prvními leukocyty, u kterých se začal výzkum funkce UCP2 rozvíjet, ale postupně byla zjištěna nezastupitelná role UCP2 téměř ve všech typech imunitních buněk, čemuž se podrobněji věnují další kapitoly této práce.

UCP2 se řadí, stejně jako další UCP, do rodiny mitochondriálních aniontových přenašečů SLC25. Jeho detailní struktura byla určena v roce 2011 v komplexu s guanosin difosfátem (guanosine diphosphate – GDP) pomocí nukleární magnetické resonance (Berardi et al., 2011) a nyní jí najdeme v Protein Data Bank pod ID 2LCK (<https://www.rcsb.org/structure/2LCK>). Při objevu bylo ukázáno, že se struktura UCP2 výrazně podobá struktuře adenin nukleotid translokázy (adenine nucleotide translocator – ANT), i přesto že se sekvenčně jejich podobnost blíží jenom zhruba 20 %. Oba tyto proteiny nalezneme v IMM, do které jsou zanořeny svými 6 transmembránovými  $\alpha$ -helixy uspořádanými tak, aby tvořili tři opakující se domény (pseudo-opakování, jak je nazval autor - viz. Obrázek 2). Rozdíl nalezneme až ve třetím opakování, kde je UCP2 více rozevřen na matrixovou stranu. To by podle autora mohlo naznačovat klíčovou roli této části v rozdílné funkci obou proteinů. V každém případě toto zjištění pomohlo při určování funkce UCP2 a nasměrování dalšího výzkumu.

ANT katalyzuje transport ATP z matrix mitochondrie do cytoplazmy a naopak transport ADP zpátky do matrix, které zde může být znovu uplatněno při syntéze ATP katalyzované  $F_0F_1$ -ATP syntázou. Tento proces je závislý na membránovém potenciálu tvořeném  $H^+$  ionty (Pfaff and Klingenberg, 1968), což působení UCP2 a ANT v jistém smyslu propojuje, jelikož UCP2 umožňuje průchod protonů zpět do mitochondriální matrix, čímž přispívá ke snižování membránového potenciálu. Navíc se ANT také výrazně zapojuje ve zpětném průchodu protonů z IMS do matrix. ANT je však v mitochondriích mnohem více zastoupeno než UCP2. Tvoří až 10 % všech mitochondriálních proteinů, takže k průchodu protonů přispívá výrazně více než UCP2, až o dva řády (Brand et al., 2005). UCP2 tvoří jenom zhruba 0,1 % až 1 % mitochondriálních proteinů v závislosti na tkáni, největší podíl UCP2 nalezneme ve slezině (Pecqueur et al., 2001).



Obrázek 2- Struktura UCP2 a ANT1: a) Pohled ze strany na strukturu UCP2 a ANT1 (Protein Data Bank ID 1OKC). Barevně jsou odlišené jednotlivé pseudo-opakování, první (residua 14-112) modře, druhé (residua 113-210) zelené a třetí (residua 211-309) růžově. b) Pohled z matrixové strany na strukturu UCP2 a ANT1, kde je názorně vidět rozdíl především v třetím pseudo-opakování, které u UCP2 způsobuje větší rozevření a zároveň ztrátu zdánlivé symetrie složeného proteinu. Šipky znázorňují orientaci amfipatických helixů. Zkratky: UCP2 (odpřahující protein 2), ANT1 (adenosin nukleotid translokáza 1), C (C-konec proteinu), N (N-konec proteinu), APH (amfipatický helix), TMH (transmembránový helix). Převzato a upraveno: (Berardi et al., 2011).

## 2.3 UCP3, UCP4 a UCP5

Lidské UCP3 se vyznačuje zhruba 57% sekvenční podobností s UCP1. Jeho exprese byla zjištěna ve skeletárním svalstvu, bílé tukové tkáni a také v BAT. Od počátku byl považován za jakéhosi „dvojníka“ UCP2, kterému se přisuzovala obdobná funkce jenom s tím rozdílem, že byla vykonávána v jiné tkáni. Bylo tomu tak kvůli vysoké 75% sekvenční podobnosti mezi UCP2 a UCP3 (Boss et al., 1997). Dnes již víme o dalších tkáních s expresí UCP3 jako je například tkáň srdeční a výzkum se pomalu přesouvá od jeho role ve skeletárním svalstvu směrem k zřejmě podstatnější roli v BAT. Na myším modelu se ukázalo, že má UCP3 v BAT až o řád vyšší expresi než ve skeletárním svalstvu a mohl by zde napomáhat netřesové termogenezi zprostředkovávané UCP1. Přesný mechanismus zatím není znám, pravděpodobně však nespočívá v odpřahující funkci. Tu sice UCP3 vykonává, ale jeho přítomnost v BAT je až 400x nižší než UCP1, takže odpřažení pomocí UCP3 v porovnání s odpřažením pomocí UCP1 celkově představuje téměř zanedbatelnou část. Důležitá může být jeho schopnost transportovat substrát, který by tak byl k dispozici pro oxidaci a následný vznik protonového gradientu nezbytného pro aktivitu UCP1 (Hilse et al., 2016).

UCP4 a UCP5 jsou exprimovány především v centrální nervové soustavě (central nervous system – CNS), a z tohoto důvodu jsou často společně označovány jako neuronální odpřahující proteiny. Jejich sekvenční podobnost k UCP1 je nejnižší ze všech UCP, přibližně 34 % pro UCP4 a 30 % pro UCP5. I přes tento fakt se UCP4 a 5 mezi odpřahující proteiny řadí, jelikož s nimi sdílejí zásadní charakteristiky jako jsou celková membránová topologie a obdobná funkce. I když se proteiny od sebe svým působením poněkud odlišují, bylo prokázáno, že celkově dokážou zprostředkovávat odpřažení průchodu protonů do mitochondriální matrix od syntézy ATP za produkce tepla. Jejich funkce však opět není omezena pouze na odpřažení, s největší pravděpodobností v CNS slouží i jako přenašeče iontů (Hoang et al., 2012). Celkově by tedy mohly mít, spolu s produkcí tepla, vliv na rychlost synaptického přenosu a buněčnou signalizaci.

## 3 Regulace UCP2

UCP2 je regulováno na transkripční, translační i posttranslační úrovni (shrnutí v: Ježek et al., 2018). Regulačních mechanismů tohoto proteinu je již známo poměrně hodně díky jeho významu v metabolismu buňky. V dalších kapitolách jsou rozvedeny 3 důležité regulátory UCP2, které se velkou mírou uplatňují i v metabolismu imunitních buněk diskutovaných v pozdějších kapitolách této práce.

### 3.1 Purinové nukleotidy

O inhibičním efektu purinových nukleotidů na protonoforní aktivitu UCP2 se hovoří téměř od počátku objevení samotného UCP2 (Jabůrek et al., 1999). Díky strukturální podobnosti s ANT a sekvenční podobnosti s UCP1, které purinové nukleotidy vázat dokážou, nepředstavovala existence vazebného místa pro purinové nukleotidy u UCP2 žádné překvapení. Je nutné podotknout, že inhibiční efekt jednotlivých purinových nukleotidů není stejný. Nejsilnějším inhibičním efektem na UCP2 působí ADP, následně ATP a guanosin trifosfát (guanosine triphosphate – GTP), ještě slabším pak GDP, úplně nejslabším adenosin monofosfát (Žáčková et al., 2003).

Vazebné místo pro purinové nukleotidy se nachází uvnitř hydrofilní kavity UCP2 (Berardi et al., 2011). Obdobně jako ANT tedy UCP2 purinové nukleotidy váže, ale už je nedokáže transportovat, nukleotidy tak zůstávají navázané a působí jako inhibitory. Navázání GDP vede k vyvázání FA, prokázaných aktivátorů UCP2 (Berardi and Chou, 2014).

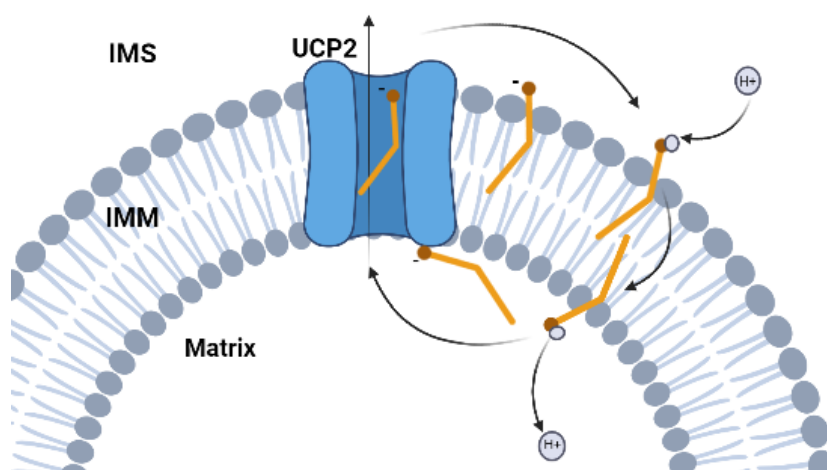
### 3.2 Mastné kyseliny

Mechanismus vyvázání FA po navázání purinových nukleotidů je alosterický. Vazebné místo pro FA se na UCP2 nachází na jeho periferii směrem na matrixovou stranu proteinu, v oblasti mezi helixy H1 a H6. Po navázání purinový nukleotid navodí konformační změnu, v jejímž důsledku dojde k vyvázání FA, případně nemožnosti FA se do svého vazebného místa navazovat (Berardi and Chou, 2014).

Role FA je pro zpětný průchod protonů do mitochondriální matrix však o něco komplikovanější než role klasických aktivátorů. FA nejspíš působí jako jednotky přenášející samotné protony, protonofory. O způsobu účinku FA na UCP2 se dlouhá léta spekulovalo a byla vytvořena řada hypotéz, nakonec se však většina autorů přiklonila k hypotéze s anglickým označením „FA-cycling mechanism“ (volně přeloženo jako mechanismus cyklujících mastných kyselin) (viz. Obrázek 3). Polární „hlavička“ aniontu mastné kyseliny se nejprve za pomoci elektrostatických interakcí naváže do vazebného místa na UCP2 mezi helixy H1 a H6 a poté se za interakce s bazickými částmi aminokyselin v hydrofilní kavitě proteinu elektrostatickou cestou transportuje na mezimembránovou stranu UCP2. Zde laterálně difunduje membránou, dojde k protonaci a protonovaná forma FA se flip-flop mechanismem přemístí zpět na matrixovou stranu membrány (Berardi and Chou, 2014). Z tohoto mechanismu je patrné, že takovou funkci mohou plnit pouze FA, které se v membráně dokážou přemisťovat flip-flop mechanismem a jsou unipolární. FA s další polární skupinou v terminální pozici

nevykazují tuto schopnost (Ježek et al., 1997). Také polynenasycené FA se prokázaly být o několik řádů lepšími aktivátory UCP2 než nasycené a mononenasycené FA, i když v podstatě jakékoli fyziologicky se vyskytující FA s delším řetězcem vedou k určité aktivaci UCP2 (Beck et al., 2007). Celý proces naznačuje, že UCP2 neslouží jako kanál pro protony, ale spíše plní svou úlohu jako přenašeč aniontů FA.

Důležité je zmínit i klíčovou úlohu, kterou hrají nascentní FA a na vápníku nezávislá mitochondriální fosfolipáza A2 $\gamma$  (calcium-independent phospholipase A2- $\gamma$  - iPLA2 $\gamma$ ) v regulaci UCP2 *in vivo*. Fosfolipáza se aktivuje zvýšenou hladinou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nebo prostřednictvím ROS-aktivovaných kináz v mitochondrii. Následně pak štěpí nascentní FA, které dále aktivují UCP2 a dochází k částečnému odpřažení za účelem snížení produkce ROS. Tato antioxidační dráha se ukázala jako zásadní pro regulaci oxidativního stresu zánětlivé reakce v buňce (Ježek et al., 2015).



*Obrázek 3 - Mechanismus cyklujících mastných kyselin: Tato ilustrace představuje velice zjednodušený model protonoforní aktivity proteinu UCP2 v mitochondrii. Mastné kyseliny se za pomoci elektrostatických sil naváží a přemístí skrz UCP2 ze strany mitochondriální matrix na stranu do IMS, kde se laterální difuzí přemísťují v membráně. Dojde k jejich protonaci a flip-flop mechanismem se mastné kyseliny přemístí opět na matrixovou stranu IMM. Zkratky: IMM (vnitřní mitochondriální membrána), IMS (mezimembránový prostor), UCP2 (odpřahující protein 2). Vlastní tvorba za účelem jednoduché ilustrace mechanismu zmiňovaného v práci (vytvořeno v [BioRender.com](https://www.biorender.com)).*

### 3.3 Glutamin

Glutamin reguluje expresi UCP2 na translační úrovni. Glutamin se váže do otevřeného čtecího rámce 1 (open reading frame - ORF) na 5' nepřekládané oblasti mRNA pro UCP2. Přítomnost ORF1 před kódující sekvencí působí inhibičním efektem při translaci mRNA UCP2. Navázání glutaminu na ORF1 tuto inhibici ruší, a umožňuje tak translaci proteinu. Přítomnost glutaminu může v myších makrofázích zvyšovat expresi UCP2 až o více než 2 řády. K indukci

glutaminem dochází velice rychle do 2 hodin (Hurtaud et al., 2007). Obdobně výrazné zvýšení exprese UCP2 bylo zaznamenáno i na makrofázích derivovaných z kostní dřeně po inkubaci v médiu s glutaminem oproti kontrolám inkubovaných v nepřítomnosti glutaminu (Nübel et al., 2008).

Hladina proteinu UCP2 dokáže poměrně rychle reagovat na hladinu glutaminu v buňce, glutamin tedy představuje zásadní a specifický nástroj pro jeho regulaci. UCP2 je nepostradatelný v proliferujících buňkách imunitního systému právě díky své roli v metabolismu glutaminu, což je dále rozvedeno v kapitole 4.3.2.

## 4 UCP2 v imunitních buňkách

UCP2 nalezneme jak v buňkách vrozené imunity, tak v buňkách imunity adaptivní (Rousset et al., 2006). O nepopiratelné expresi UCP2 v monocytech a makrofázích nebylo sporu od začátku jeho objevu, přítomnost UCP2 byla potvrzena i ve tkáňových makrofázích jako jsou Kupfferovy buňky (Larrouy et al., 1997) a mikroglie (De Simone et al., 2015). Z buněk vrozené imunity byla exprese UCP2 zjištěna ještě v žírných buňkách (Tagen et al., 2009), dendritických buňkách a neutrofilech (Rousset et al., 2006), z adaptivní imunity potom v T lymfocytech i B lymfocytech (Rousset et al., 2006).

### 4.1 Role UCP2 v makrofázích

Role UCP2 v makrofázích je zatím nejprozkoumanější z celé buněčné imunity, a proto je v první řadě shrnut tento typ imunitních buněk.

#### 4.1.1 Schopnost fagocytózy

Pohlcování apoptotických buněk fagocyty je nezbytným procesem pro správný chod organismu. Bez něj by docházelo k narušení homeostázy ve tkáních či imunitních odpovědích. Jde o komplexní děj, který je, mimo jiné, regulován právě činností UCP2.

Schopnost fagocytu pohlcovat apoptotická tělíska je úzce spjata s potenciálem na IMM. Nižší potenciál zvyšuje kapacitu fagocytózy a zároveň prodlužuje i dobu jejího trvání. Jelikož činnost UCP2 snižuje mitochondriální membránový potenciál, jeho exprese pozitivně reguluje fagocytózu. V thymu a varlatech *UCP2*<sup>-/-</sup> myši bylo prokázáno vyšší množství apoptotického materiálu, který nebyl odstraněn makrofágy (Park et al., 2011).

Snižování mitochondriálního potenciálu za pomoci UCP2 není jediným faktorem regulace fagocytózy. Potvrzuje se, že i schopnost UCP2 vázat nukleotidy a katalyzovat

transport aniontů (viz. kapitoly 3.1 a 3.2) je pro tento proces nezbytná (Lee et al., 2015). To vede k potenciálním úvahám o možnosti UCP2 přímo vnímat nukleotidy a FA uvolněné z apoptotických buněk, a v důsledku toho regulovat kapacitu fagocytózy.

#### 4.1.2 Produkce ROS

Produkce ROS představuje pro makrofágy jednu z jejich nejúčinnějších zbraní v boji s patogeny a také prostředek v intracelulární signalizaci, regulace jejich tvorby je proto zásadní pro imunitní obranu hostitele. Mechanismus tvorby ROS ve fagolysozomálních váčcích činností NADPH oxidázy byl vždy považován za klíčový v procesu oxidativního vzplanutí buňky. Tyto váčky ale nejsou jediný buněčný kompartment, kde se ROS tvoří. Významným místem jsou též mitochondrie, ve kterých dochází k tvorbě ROS při oxidativní fosforylaci v důsledku úniku elektronů z komplexů dýchacího řetězce a následné redukce kyslíku na superoxid. Novější literatura poukazuje na fakt, že i mitochondriální ROS přispívají k efektivní eliminaci patogenů v makrofázích (Basu Ball et al., 2011).

Výzkum týkající se vlivu UCP2 na produkci ROS se z velké části zabývá schopností makrofágů eliminovat infekce způsobené bakteriemi či prvoky v myších modelech. Příkladem jsou *Toxoplasma gondii* (Arsenijevic et al., 2000), *Listeria monocytogenes* (Rousset et al., 2006) a několik flagelátů z rodu *Leishmania* (Carrión et al., 2013). Ve všech případech se jedná o intracelulární patogeny infikující makrofágy. Velký význam pro jejich likvidaci má hladina ROS a oxidu dusnatého (nitric oxide – NO) produkovaných fagocytem. Ve výše zmiňovaných studiích byly sledovány makrofágy *UCP2*<sup>-/-</sup> myši při infekci v *in vitro* i *in vivo* systémech. Tyto studie se shodují v několika pozorováních. V případě *UCP2*<sup>-/-</sup> myši docházelo ke zvýšené produkci ROS a NO oproti *wild-type* myším. To následně vedlo k efektivnější eliminaci patogenů a zvýšenému přežívání buněk hostitele. Těmito výsledky bylo potvrzeno, že UCP2 negativně reguluje tvorbu ROS. Navíc se zjistilo, že *Leishmania donovani* při infekci, mimo jiné, cíleně zvyšuje expresi proteinu UCP2. Snížení tvorby ROS naruší aktivaci inflamasonu a dojde ke snížení odpovědi buněk hostitele (Basu Ball et al., 2011).

Zásadní úloha UCP2 při parazitárních infekcích je dokumentována na nejnovějších výzkumech léčby leishmaniózy, kdy se prostřednictvím inhibice UCP2 dosahuje mnohem vyšší míry eliminace parazita buňkami imunitního systému, zejména makrofágy. Kombinace inhibitoru UCP2 a již používaných léčiv se ukazuje být velmi slibná při léčbě viscerální leishmaniózy (Gupta et al., 2021).

Negativní vliv UCP2 na tvorbu ROS není zdaleka tak přímočarý, jak by se mohlo zdát. Protonoforní aktivita, která způsobuje odpřažení za pomoci FA, se uplatňuje jen z určité části. Nové studie vyzdvihují další funkci UCP2, která se pravděpodobně významně podílí na regulaci transportu metabolitů ven z mitochondriální matrix. Jedná se především o metabolity skládající se ze čtyř uhlíků jako jsou aspartát, oxalacetát a malát. Všechny zmíněné jsou důležitými intermediáty metabolických drah, tím pádem se dá mluvit o velkém významu UCP2 v metabolismu (viz. kapitola 4.3.2). Transport těchto C4 metabolitů ven z mitochondriální matrix probíhá výměnou za cytosolický fosfor a proton, což z velké míry přispívá právě ke snížení produkce ROS v buňce (Vozza et al., 2014).

### 4.1.3 Produkce cytokinů a NO

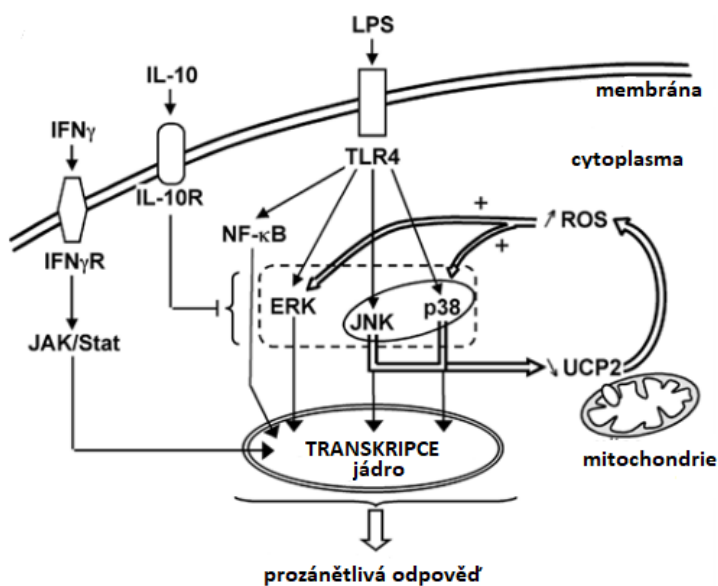
ROS ovšem neslouží pouze jako účinné nástroje makrofágů, svou funkci plní i v podobě druhých posílů v buňce, a ovlivňují tak produkci prozánětlivých cytokinů buňkou (shrnutí v: Gloire et al., 2006). Prostřednictvím mitochondriálních ROS dochází k ovlivnění dráhy mitogenem aktivovaných proteinkináz (mitogen-activated protein kinase – MAPK), aktivaci jaderného transkripčního faktoru kappa B buněk (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells - NF- $\kappa$ B) a aktivaci inflamasomu po stimulaci buňky lipopolysacharidem (lipopolysaccharide – LPS) vazbou na Toll-like receptor 4.

Transkripční faktor NF- $\kappa$ B je v cytoplazmě konstitučně inhibován asociací s inhibítozem I $\kappa$ B, který zabraňuje dimerizaci NF- $\kappa$ B a jeho přesunu do jádra. Klíčovým krokem pro uvolnění inhibice I $\kappa$ B je fosforylace aktivovanou I $\kappa$ B kinázou, která označí I $\kappa$ B k degradaci, tím pádem dojde k jeho uvolnění a NF- $\kappa$ B se může translokovat do jádra, kde plní svou funkci transkripčního faktoru. Tato dráha je spouštěna v reakci na endo a exotoxiny, např. v případě stimulace LPS. Stimulace NF- $\kappa$ B dráhy vede k transkripci genů pro prozánětlivé cytokiny, které jsou součástí prozánětlivé odpovědi makrofágů (shrnutí v: Gloire et al., 2006). UCP2 zmíněnou dráhu ovlivňuje regulací ROS. Ty se uplatňují při aktivaci I $\kappa$ B kinázy (Kim et al., 2008). Zmíněný mechanismus byl ověřen ve studii, kde makrofágy získané z *UCP2*<sup>-/-</sup> myši po stimulaci LPS vykazovaly vyšší hladiny I $\kappa$ B kináz, přirozeně pak nižší hladiny I $\kappa$ B a v jádře následně vyšší hladiny samotného NF- $\kappa$ B. Zvýšená hladina I $\kappa$ B kináz byla prokázána ve slezině *UCP2*<sup>-/-</sup> myši. Inhibitory ROS v izolovaných makrofázích z *UCP2*<sup>-/-</sup> myši kompletně blokovaly aktivaci I $\kappa$ B kináz (Bai et al., 2005)

Snížení exprese UCP2 dokáže mimo NF- $\kappa$ B dráhu modulovat také indukci MAPK dráhy, kde se pravděpodobně jedná o zpětnovazebnou smyčku mezi UCP2 a danými kinázami.



Zvýšená tvorba ROS vede k aktivaci ERK a p38 kináz, v nepřítomnosti UCP2 tedy dochází až k o 30 minut rychlejší, tím pádem celkově silnější, aktivaci těchto kináz. Zvýšená hladina ROS však neovlivňuje aktivitu třetí kinázy z MAPK rodiny - JNK kinázy. JNK kináza ale naopak ovlivňuje expresi UCP2. Po stimulaci LPS dochází ke snižování exprese UCP2 v buňce právě prostřednictvím JNK kinázy spolu s p38 kinázou. Následné zvýšení produkce ROS pak vede k silnější aktivaci ERK a p38 kináz a účinnější prozánětlivé odpovědi makrofágu, především v důsledku zvyšování hladiny NO (viz. Obrázek 4). U makrofágů *UCP2*<sup>-/-</sup> myši byla skutečně pozorována až o dva řády vyšší produkce NO (Emre et al., 2007a). Dráha p38 vede přes aktivaci transkripčního faktoru ATF-2 k další aktivaci indukibilní NO-syntázy, která se následně uplatňuje při produkci NO (Bhat et al., 2002). Pozornost byla tedy věnována i tomuto transkripčnímu faktoru a byla odhalena jeho zvýšená fosforylace v *UCP2*<sup>-/-</sup> myších, která poskytla další důkaz, že je MAPK signalizace zapojena ve zvyšování produkce NO důsledkem zvýšené produkce ROS (Emre et al., 2007a).



Obrázek 4 - Role UCP2 v MAPK signalizaci: Rozpoznání LPS TLR4 aktivuje JNK, p38 a ERK dráhy. Mezitím se spouští ROS signalizační dráha. Expze UCP2 je rychle snížena v odpovědi na LPS prostřednictvím JNK a p38 dráhy za účelem zvýšení hladiny mitochondriálních ROS. Mitochondriální produkce ROS, jako zpětná smyčka, stimuluje ERK a p38 dráhy. Zkratky: ERK (extracelulární signálem regulovaná kináza), IFN $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ), IFN $\gamma$ R (interferon  $\gamma$  receptor), IL-10 (interleukin 10), IL-10R (interleukin 10 receptor), JAK/Stat (Janus kinázy/signální transduktor a aktivátor transkripce dráha), JNK (c-Jun N-terminální kináza), LPS (lipopolysacharid), MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázy), NF- $\kappa$ B (nukleární faktor kappa B), p38 (p38 mitogenem aktivovaná proteinkináza), ROS (reaktivní formy kyslíku), TLR4 (toll-like receptor 4), UCP2 (odpřahující protein 2). Převzato a upraveno: (Emre et al., 2007a).

Vliv UCP2 byl popsán i na NLRP3 inflamasom. Zvýšení exprese UCP2 vzápětí snižuje expresi NLRP3 inflamasomu v makrofázích prostřednictvím nižších hladin ROS, takže zvýšením exprese UCP2 se dá regulovat příliš vysoká aktivace inflamasomu a následně i aktivace kaspázy-1 a sekrece interleukinů-1 $\beta$  (interleukin – IL). Tím se dají mírnit projevy některých autoimunitních onemocnění (Wang et al., 2018). Z výsledků v této kapitole vyplývá, že pomocí UCP2 je možné regulovat určité signální dráhy v makrofázích, jelikož má díky své schopnosti výrazně snižovat tvorbu ROS v mitochondriích po stimulaci endo a exotoxiny velice široké uplatnění v buněčných procesech.

#### 4.1.4 Schopnost migrace

Redoxní stav buňky dokáže také působit na expresi integrinů na membráně. ROS (konkrétně pak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zvyšují expresi diferenciacních skupin (cluster of differentiation – CD) CD11b a CD18, které zprostředkovávají buněčnou adhezi v monocyttech (Skoglund et al., 1988). CD11b je podstatné pro transmigraci monocytů a jejich celkové rekrutování do místa zánětu. Při zvýšení exprese UCP2 dochází k redukci povrchových CD11b až o 80 %, což omezuje adhezi monocytů na epitel (Ryu et al., 2004). UCP2 tudíž slouží jako negativní regulátor migrace monocytů/makrofágů do místa zánětu (Emre et al., 2007a). Toto zjištění dále podtrhuje význam snižování exprese UCP2 po aktivaci makrofágů pro schopnost migrace.

## 4.2 Role UCP2 v dalších typech buněk vrozené imunity

Co se týče buněk vrozené imunity, byla exprese UCP2 mimo makrofágů potvrzena ještě v žírných buňkách (Tagen et al., 2009), dendritických buňkách a neutrofilech (Rousset et al., 2006). Tyto buňky patří mezi profesionální fagocyty, a tak by se u nich dala předpokládat obdobná role UCP2 při fagocytóze jako u makrofágů zmíněná v kapitole 4.1.1. Vliv UCP2 na průběh fagocytózy byl prokázán jak u profesionálních, tak u neprofesionálních fagocytů a zdá se být v imunitních buňkách poměrně obecný (Park et al., 2011).

U neutrofilů byl pozorován negativní vliv UCP2 na migraci (Rousset et al., 2006) a vzhledem k prokázanému pozitivnímu vlivu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na adhezi a migraci za pomoci CD18 (Gasic et al., 1991) se dá předpokládat, že UCP2 snižuje migraci neutrofilů právě snížením exprese molekuly CD18. Výzkum cílený na UCP2 v neutrofilech není obsáhlý, na druhou stranu je ale v neutrofilech známa řada signálních drah regulovaných hladinou mitochondriálních ROS. Hlavními drahami jsou NF- $\kappa$ B a MAPK (Asehnoune et al., 2004) a dráhy vedoucí k oxidativním vzplanutím (Vorobjeva et al., 2017). V neutrofilech by se tedy dala

předpokládat obdobná úloha UCP2 jako v makrofázích popsaná v kapitolách 4.1.1 až 4.1.4. Domnívám se, že budoucí výzkum může přinést zajímavé výsledky týkající se rozsahu role UCP2 v neutrofilech, jelikož se mitochondriální ROS účastní také ještě drah vedoucích k degranulaci a apoptóze neutrofilů (Vorobjeva et al., 2017). Dokonce i tvorba neutrofilních extracelulárních pastí je sensitivní na mitochondriální ROS (Lood et al., 2016). Tato výhradní schopnost neutrofilů je také potenciálně regulovatelná za pomoci UCP2.

V žírných buňkách UCP2 snižuje degranulaci a produkci histaminu po antigenní i FcεRI nezávislé stimulaci. Děje se tak snižováním hladin ROS, které indukují histidin karboxylázu. Nižší hladiny ROS v žírných buňkách dále vedou k nižší fosforylaci ERK kinázy, v důsledku čehož se produkuje méně prostaglandinu D2. V přítomnosti UCP2 je snižená i produkce IL-6. V případě alergických reakcí je tedy exprese proteinu UCP2 velice žádoucí a v případě jeho inhibice by mohlo docházet k těžšímu průběhu nejenom alergií, ale i prozánětlivých onemocnění týkajících se žírných buněk (Tagen et al., 2009).

Z výše uvedených závěrů je patrné, že působení UCP2 má v buňkách vrozené imunity podobný charakter. Navzdory tomu, že byl dosavadní výzkum věnován především makrofágům, dají se zjištění do jisté míry generalizovat i na procesy odehrávající se v ostatních buňkách vrozené imunity.

## 4.3 Role UCP2 v T lymfocytech

Na začátek kapitoly je důležité zmínit, že výzkum role UCP2 v T lymfocytech představuje velice aktuální téma, kterému v minulosti nebyla věnována velká pozornost. Cílem mnoha studií byly buňky vrozené imunity, přičemž docházelo k opomíjení buněk imunity adaptivní. V současné době se ukazuje, že by UCP2 mohlo v těchto buňkách hrát stejně důležitou, ne-li důležitější, roli v řadě buněčných procesů diskutovaných dále. Pro jednoznačné potvrzení jsou zcela jistě zapotřebí další data.

### 4.3.1 Produkce ROS

Na počátku aktivace T lymfocytů slouží hladina ROS jako určitá „spojka“ mezi regulací buněčného metabolismu a buněčné signalizace (Sena et al., 2013). U CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buněk myši s deficitním UCP2 byla, obdobně jako u makrofágů, zaznamenána zvýšená hladina ROS oproti *wild-type* jedincům (Vogler et al., 2006). To dokazuje, že se u T lymfocytů UCP2 na regulaci ROS skutečně podílí. Jejich produkce však musí být v buňce striktně regulována, neboť vysoká hladina způsobuje apoptózu T lymfocytů a následné zastavení klonální expanze (Chaudhuri et al., 2016).

ROS produkované v mitochondriích jsou pro aktivaci T lymfocytů zásadní. Jako ROS senzitivní se ukazují být MAPK dráha a dráha jaderného faktoru aktivovaných T buněk (nuclear factor of activated T-cells – NFAT), které jsou nezbytné pro produkci IL-2 (Sena et al., 2013).

#### 4.3.2 Metabolismus buňky

Jak bylo popsáno v kapitole 4.1.2, při regulaci ROS se neuplatňuje pouze protonoforní aktivita UCP2. Na tomto procesu má nejspíš mnohem významnější podíl schopnost UCP2 transportovat C4 metabolity ven z mitochondrie za současného antiportu cytosolického fosforu a protonu. Jelikož se tímto procesem proton dostává přes IMM do mitochondriální matrix, dochází tak k odprážení vedoucím ke snižování potenciálu IMM a hladiny ROS v mitochondrii. Mimo jiné zmíněná aktivita UCP2 ovlivňuje i Krebsův cyklus. Krebsův cyklus je transportem intermediátů ven z mitochondrie negativně regulován, a tím dochází i k nižší činnosti ETC a následné produkci ROS (Raho et al., 2020). Touto regulací UCP2 může ovlivňovat úbytek antigenem stimulovaných CD8<sup>+</sup> T buněk v důsledku oxidativního stresu buněk (Chaudhuri et al., 2016).

Na rozdíl od mechanismu popsaného v makrofázích, kde po stimulaci LPS dochází ke snižování exprese UCP2 (Emre et al., 2007a), v T lymfocytech po indukci antigenem přes T-buněčný receptor (T cell receptor – TCR) dochází ke zvyšování exprese UCP2. Mechanismus v T lymfocytech bohužel ještě není objasněn. Výzkum naznačuje, že se jedná především o spojitost mezi UCP2 a buněčným metabolismem (Rupprecht et al., 2012), konkrétně pak o glykolytický metabolismus po aktivaci T lymfocytů (Greiner et al., 1994). Pro expresi UCP2 je nejspíš podstatný zvýšený přísun glutaminu při glykolýze, jak bylo uvedeno v kapitole 3.3. Tato regulace ale není pouze jednostranná. UCP2 transportuje, respektive odebírá, C4 metabolity z mitochondrie, a tak pohání kontinuální tvorbu  $\alpha$ -ketoglutarátu, jednoho z produktů glutaminolýzy, za účelem doplnění chybějících intermediátů, čímž glutaminolýzu neustále stimuluje (Rupprecht et al., 2019). Souhrnně by tyto závěry naznačovaly, že zvýšená exprese UCP2 není příčinou, ale spíš důsledkem glykolytického metabolismu, avšak k prokázání tohoto mechanismu je zapotřebí ještě dalšího výzkumu.

#### 4.3.3 Proliferace a diferenciaci buňky

Po aktivaci dochází v T lymfocytech k jejich proliferaci, která je umožněna rychlým přechodem buňky na aerobní glykolýzu (Greiner et al., 1994). Aerobní glykolýza je ovšem

důležitá i pro následnou diferenciaci T lymfocytů spojenou s produkcí cytokinů (Chang et al., 2013).

V T buňkách je UCP2 spojován zejména s proliferací. Proces aktivace T lymfocytů je velice rychlý, ale zvýšená hladina UCP2 je pozorována až v řádu několika hodin po ní, s maximem okolo čtvrtého dne. Toto zjištění opět podporuje hypotézu, že by zvýšená hladina UCP2 byla spíš důsledkem probíhající proliferace buňky než jejím spouštěčem (Rupprecht et al., 2012). Exprese UCP2 má dále v aktivovaných CD8<sup>+</sup> T buňkách vliv i na terminální diferenciaci. Výzkum tedy naznačuje, že UCP2 by mohl být jedním z regulačních mechanismů stojících na hranici mezi klonální expanzí, terminální diferenciací a apoptózou (Chaudhuri et al., 2016).

Nedávná studie na nádorových buňkách potvrdila, že při nadměrné expresi UCP2 dochází ke zvýšení glykolýzy v buňkách. Na druhou stranu velká část uhlíků z glykolýzy nekončí zabudována do laktátu, ale do pyruvátu, který následně vstupuje do Krebsova cyklu, jehož intermediáty slouží k *de novo* syntéze nukleotidů a aminokyselin. UCP2 by se tedy mohl podílet na zvyšování míry proliferace právě tím, že stimuluje biosyntézu nukleotidů potřebných pro syntézu DNA a produkci RNA (Sreedhar et al., 2019). Role UCP2 v metabolismu vysoce proliferujících buněk je v tuto chvíli opravdu nesporná, avšak k objasnění jejího mechanismu bude zapotřebí dalších studií.

#### 4.4 Role UCP2 v B lymfocytech

Co se týče B lymfocytů, zatím toho o úloze UCP2 mnoho nevíme. Ze zjištění o funkci UCP2 v T lymfocytech by se dalo uvažovat o potenciální implikaci UCP2 v metabolismu B buněk. UCP2 je však podstatné i pro vývoj B lymfocytů. K takovým závěrům vedou výsledky výzkumu B buněk při myelodysplastickém syndromu. Byly pozorovány klesající počty B buněk v kostní dřeni s přibývajícím věkem *UCP2*<sup>-/-</sup> myši oproti stejně starým *wild-type* jedincům. Zároveň zde byl pozorován i vzestup počtu buněk vrozené imunity (Kretzschmar et al., 2016). Autoři tedy na závěr svého výzkumu navrhují, že deficit UCP2 vede v buňkách adaptivní imunity k narušení jejich správného vývoje a funkce. Toto narušení by mohlo být kompenzováno zvýšením celkové aktivity buněk vrozené imunity. Molekula UCP2 by tak mohla zásadně ovlivňovat poměr buněk vrozené a adaptivní imunity v kostní dřeni v průběhu života (Kretzschmar et al., 2016). Tato hypotéza může znít přesvědčivě, avšak studie byla zaměřena především na schopnost UCP2 negativně regulovat hladiny ROS. Pro její potvrzení by bylo příhodné se zaměřit ještě na roli UCP2 v metabolismu.

Dále by bylo zajímavé vidět, zda by tato hypotéza mohla mít uplatnění i ve spojitosti se zjištěním, že po aktivaci T buněk exprese UCP2 vzrůstá, zatímco po aktivaci makrofágů exprese UCP2 výrazně klesá, jak bylo zmíněno v kapitole 4.3.2. Kdyby se tedy tato hypotéza přenesla na situaci po aktivaci imunitních buněk např. při infekci, mohlo by to znamenat, že by v myších s deficitním UCP2 byla narušená adaptivní imunita kompenzována vrozenou imunitou v boji s patogeny? To jsou samozřejmě velice předčasné úvahy, které potřebují dalšího výzkumu.

Stejně jako v jiných buněčných typech, i v B lymfocytech UCP2 negativně reguluje hladinu mitochondriálních ROS (Kretzschmar et al., 2016). Obdobně jako u T lymfocytů se v případě B lymfocytů exprese UCP2 po aktivaci zvyšuje. Snížení hladiny ROS zamezuje oxidativnímu stresu a následné apoptóze buňky. B lymfocyty *UCP2*<sup>-/-</sup> myši skutečně vykazují vyšší míru apoptózy v důsledku zvýšené hladiny ROS po stimulaci LPS a cytokiny (Cao et al., 2013). UCP2 se s největší pravděpodobností také uplatňuje v regulaci humorální imunity. U *UCP2*<sup>-/-</sup> myši dochází k narušení humorální odpovědi po stimulaci LPS a cytokiny. Konkrétně se snižují hladiny imunoglobulinů G (immunoglobulin G – IgG): IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, zatímco hladiny IgM jsou srovnatelné s *wild-type* myšmi *in vivo* i *in vitro*. Naopak za bazálních podmínek jsou u *UCP2*<sup>-/-</sup> myši hladiny všech čtyř IgG vyšší oproti *wild-type* jedincům. Možným vysvětlením by bylo, že při deficitu UCP2 vysoká hladina ROS narušuje aparát zodpovědný za izotypový přesmyk u B lymfocytů poškozeními v DNA (Cao et al., 2013).

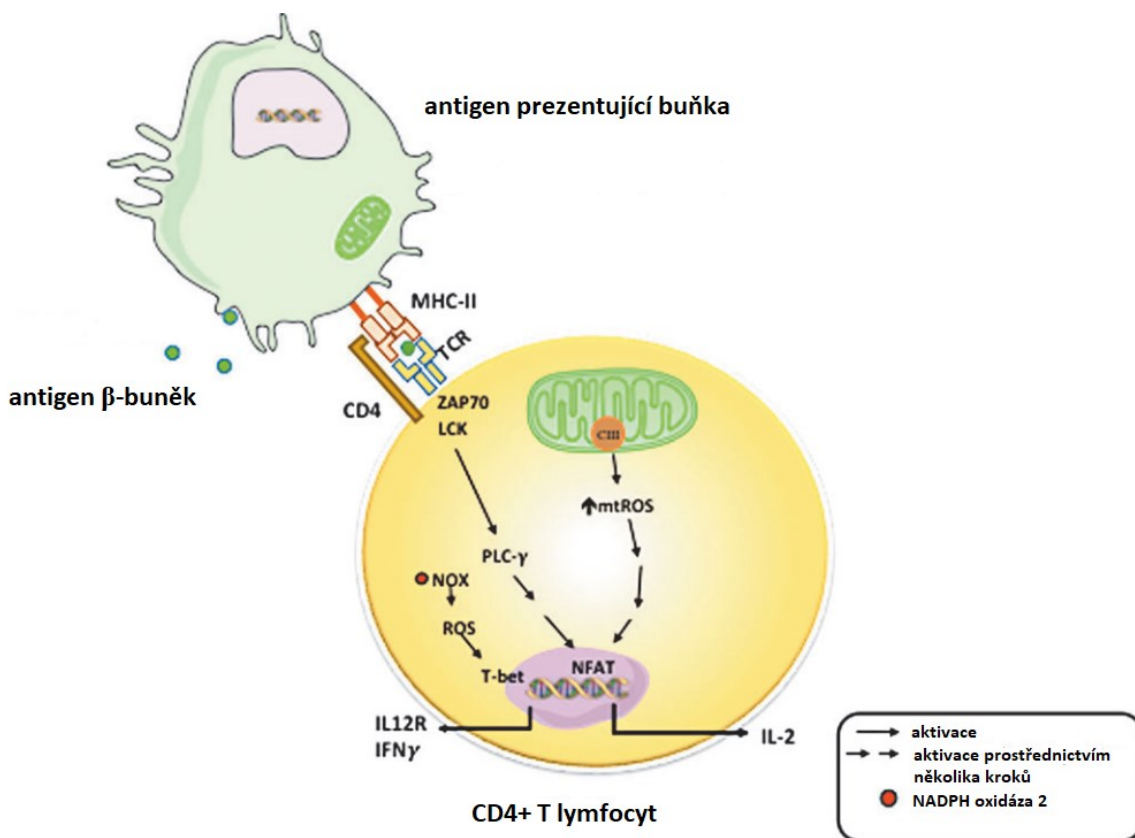
## 5 Role UCP2 ve vybraných onemocněních

### 5.1 Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu (type 1 diabetes mellitus – T1DM) je příkladem chronického autoimunitního onemocnění. Vyznačuje se destrukcí  $\beta$ -buněk pankreatu buňkami imunitního systému.  $\beta$ -buňky produkují inzulin, který se po jejich destrukci nemůže produkovat v dostatečné míře (shrnutí v: Chen et al., 2018). Role UCP2 v T1DM není zcela jasná, avšak již v tuto chvíli jsou patrná potenciální využití tohoto proteinu při léčbě.

Původně bylo pozorováno, že u myši s T1DM jako první dochází k rekrutování makrofágů a dendritických buněk do Langerhansových ostrůvků (Hanenberga et al., 1989). Novější závěry naznačují, že zmiňované makrofágy jsou tkáňově rezidentní, takže jsou v Langerhansových ostrůvcích přítomny ještě před rozvojem T1DM (Ferris et al., 2017). K patologii onemocnění makrofágy přispívají jako buňky prezentující antigen T lymfocytům

a produkcí chemokinů atrahujících lymfocyty do tkáně. Nikoli tedy jako buněčný typ primárně atakující  $\beta$ -buňky, i když zvýšená produkce ROS  $\beta$ -buňky také poškozuje (Thayer et al., 2011). Makrofágy produkují ROS a prozánětlivé cytokiny jako IL-1 a tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$  - TNF- $\alpha$ ) v Langerhansových ostrůvcích, které vytváří potřebné prozánětlivé prostředí k aktivaci T lymfocytů (Tse et al., 2007). Potlačení funkce makrofágů zásadně ovlivní vývoj onemocnění, především snížením inzulinity a zvýšením antioxidačního stavu u neobězních diabetických myši (Papaccio et al., 1998). Makrofágy *UCP2*<sup>-/-</sup> myši vykazují zvýšenou produkci NO a IL-1 v ostrůvcích (Emre et al., 2007b) nejspíše důsledkem vlivu UCP2 na signalizační dráhy v makrofázích popsané v kapitole 4.1.3. UCP2 tedy tlumí prozánětlivý fenotyp makrofágů v Langerhansových ostrůvcích.



Obrázek 5 - Role ROS v aktivaci T lymfocytů při rozvoji onemocnění diabetes mellitus 1. typu: Mitochondrie hrají klíčovou roli v aktivaci a regulaci T lymfocytů po stimulaci antigenem. Mitochondriální ROS jsou nezbytné pro antigeně-specifickou aktivaci T lymfocytů prostřednictvím aktivace NFAT dráhy a následné produkce IL-2. Cytoplasmatické ROS produkované NADPH oxidázou jsou důležité pro efektorovou odpověď zahrnující zvýšení regulace T-bet, expresi IL-12R a produkce IFN- $\gamma$ . Zkratky: IFN- $\gamma$  (interferon gamma), IL (interleukin), LCK (pro lymfocyty specifická protein tyrosin kináza), mtROS (mitochondriální reaktivní formy kyslíku), NOX (NADPH oxidáza), NFAT (jaderný faktor aktivovaných T buněk), PLC- $\gamma$  (fosfolipáza C gamma), ROS (reaktivní formy kyslíku), TCR (T-buněčný receptor). Převzato a upraveno: (shrnuto v: Chen et al., 2018).

Imunitní buňky, které při T1DM přímo napadají  $\beta$ -buňky, jsou T lymfocyty. Při onemocnění dochází k infiltraci  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T lymfocytů, které rozpoznávají autoantigeny  $\beta$ -buněk a ty jsou následně zabity (Dudek et al., 2006). Jak bylo popsáno v kapitolách 4.3.1 až 4.3.3, mitochondriální produkce ROS je pro antigenní aktivaci T lymfocytů velice podstatná, jelikož vede k aktivaci významných signalizačních drah jako NFAT a následné indukci produkce IL-2 (viz. Obrázek 5). UCP2 prostřednictvím negativní regulace ROS tedy aktivaci T lymfocytů také ovlivňuje. Dále je u všech typů T lymfocytů při T1DM pozorována hyperpolarizace IMM vedoucí k vyšší produkci ROS a prozánětlivých cytokinů (Chen et al., 2017), které se dá změnou exprese UCP2 zabránit.

Poznatky uvedené v této kapitole naznačují, že ovlivnění metabolismu imunitních buněk při T1DM může sloužit při terapii tohoto onemocnění. Ze zjištění, že u *UCP2<sup>-/-</sup>* myši dochází k těžšímu průběhu T1DM (Emre et al., 2007b) by se dalo soudit, že zvýšení exprese UCP2 v imunitních buňkách při T1DM může do jisté míry sloužit jako nástroj regulace zmiňovaného metabolismu. Studie dokazují, že za pomoci zvýšení exprese UCP2 se dají zmírňovat i projevy diabetického onemocnění v dalších orgánech jako je například hypoxie ledvin a proteinurie (Friederich-Persson et al., 2018).

## 5.2 Alzheimerova a Parkinsonova choroba

Neurodegenerativní onemocnění jsou v řadě případů spojená s nesprávnou funkcí mitochondrií, a tím způsobeným oxidativním stresem neuronů vedoucím k apoptóze (Cardoso et al., 2004; Langston et al., 1999). V dnešní době se na léčbu Alzheimerovy choroby používá řada antioxidantních látek (Kupersmidt et al., 2012). Efektivním řešením by mohlo být ROS nejenom zpětně eliminovat, ale zabránit jejich produkci na samém začátku. K tomuto účelu slouží právě UCP2. Exprese UCP2 je při Alzheimerově chorobě v mozku snížena (Thangavel et al., 2017). Bylo dokázáno, že zvýšení exprese UCP2 za pomoci olenalové kyseliny vede k nižšímu oxidativnímu stresu a tím pádem mírnějšímu projevu Alzheimerovy choroby (Guo et al., 2020). Obdobně i u Parkinsonovy choroby UCP2 reguluje oxidativní stres a metabolismus buňky, chrání dopaminergní neurony v *substantia nigra* před neurotoxickými vlivy (Andrews et al., 2005). Už dvojnásobné zvýšení exprese UCP2 vede u transgenních myši k neuroprotekcí (Conti et al., 2005). Z uvedených výsledků je patrné, že zvýšení exprese UCP2 při uvedených neurodegenerativních onemocněních je velice slibný terapeutický cíl k tlumení jejich projevu.



Neurodegenerativní onemocnění jsou v pokročilejších stádiích také úzce spjata se zánětem. Zánětu se účastní nejenom imunitní systém mozku jako jsou mikroglie (Sailasuta et al., 2011), ale i periferní imunitní systém v podobě T lymfocytů (Shalit et al., 1995) a žírných buněk (Silverman et al., 2000). Tyto imunitní buňky produkují prozánětlivé cytokiny a způsobují zvýšenou propustnost hematoencefalické bariéry (shrnutí v: Kempuraj et al., 2017). Předešlé kapitoly této práce ukazují, jak lze za pomoci zvýšené exprese UCP2 i v tomto případě zánět zmírnit především snížením degranulace žírných buněk a produkce prozánětlivých cytokinů různými typy imunitních buněk.

### 5.3 Ulcerózní kolitida

Ulcerózní kolitida patří mezi idiopatické střevní záněty projevující se zejména chronickým autoimunitním zánětem střev. Incidence ulcerózní kolitidy v posledních 50 letech rapidně stoupá a představuje veliké riziko pro moderní společnost (shrnutí v: Kaplan and Ng, 2017). Tento chronický zánět se vyznačuje zvýšenou hladinou ROS a přítomností prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$  (Ma et al., 2018). Při kolitidě dochází ke zvýšení exprese NF- $\kappa$ B transkripčního faktoru v makrofázích, což má za následek vyšší produkci prozánětlivých cytokinů (Neurath and Pettersson, 1997). Snížení exprese NF- $\kappa$ B a snížení hladiny ROS v makrofázích se ukazuje jako jeden z účinných nástrojů při tlumení příznaků tohoto onemocnění (Ma et al., 2018). Obdobně pak také inhibice signalizace MAPK drah (Gao et al., 2019). V kapitolách 4.1.2 a 4.1.3 je popsán negativní vliv UCP2 na tvorbu ROS a aktivaci NF- $\kappa$ B dráhy. Skutečně bylo potvrzeno, že u *UCP2*<sup>-/-</sup> myši dochází k mnohem závažnějším projevům zánětu střev (Zhang et al., 2012).

Nadměrná činnost NLRP3 inflamasomu a následná produkce IL-1 $\beta$  s aktivací kaspázy-1 jsou další děje spjaté s patogenezí chronického zánětlivého prostředí ve střevě při kolitidě (Liu et al., 2017). Nadměrné činnosti NLRP3 inflamasomu se dá zabránit buď snížením fosforylace NF- $\kappa$ B dráhy, která představuje první nezbytný signál pro syntézu NLRP3 podjednotky inflamasomu, nebo snížením tvorby ROS, jež představují druhý signál pro sestavení NLRP3 podjednotky inflamasomu (Wang et al., 2018). V této studii bylo snížení hladiny ROS dosaženo právě přes dráhu zvýšení exprese UCP2 a to opravdu vedlo k potlačení nadměrné aktivity NLRP3 inflamasomu spolu se zmírněním průběhu onemocnění. Exprese UCP2 hraje tedy i v případě idiopatických střevních zánětů protektivní roli. Je velmi pravděpodobné, že se zvyšování jeho exprese bude v budoucnu uplatňovat při antioxidační léčbě těchto onemocnění v čím dál vyšší míře.

## 6 Závěr

Odpřahující protein UCP1 je dobře známý pro svou roli v netřesové termogenezi. Od roku 1997 došlo k objevům dalších 4 odpřahujících proteinů, u kterých se až do současné doby postupně odkrývá celá řada nových funkcí. Tato práce se věnovala aktivitě druhého objeveného proteinu UCP2 v jednotlivých typech buněk vrozené i adaptivní imunity.

*Tabulka 1 - Souhrn role UCP2 v jednotlivých typech buněk: \* Hvězdičkou jsou označeny předpokládané funkce UCP2 v daných typech buněk na základě současných znalostí, podrobněji rozvedeno v textu práce. Zkratky: IMM (vnitřní mitochondriální membrána), NET (neutrofilní extracelulární pastě), ROS (reaktivní formy kyslíku). Vlastní tvorba.*

Typ buněk	UCP2:	
	Zvyšuje	Snižuje
<b>Makrofágy</b>	Kapacita a trvání fagocytózy (Park et al., 2011) Transport C4 metabolitů ven z mitochondrie (*předpoklad)	Potenciál IMM a tvorba ROS (Arsenijevic et al., 2000) Migrace (Emre et al., 2007a) Produkce prozánětlivých cytokinů a NO (Emre et al., 2007a, 2007b)
<b>Neutrofilly</b>	Kapacita a trvání fagocytózy (Park et al., 2011)	Potenciál IMM a tvorba ROS (Rousset et al., 2006) Migrace (Rousset et al., 2006) Degranulace (*předpoklad) Tvorba NET (*předpoklad) Produkce prozánětlivých cytokinů (*předpoklad)
<b>Dendritické buňky</b>	Kapacita a trvání fagocytózy (Park et al., 2011)	Potenciál IMM a tvorba ROS (*předpoklad)
<b>Žírné buňky</b>	Kapacita a trvání fagocytózy (Park et al., 2011)	Potenciál IMM a tvorba ROS (Tagen et al., 2009) Degranulace (Tagen et al., 2009) Produkce prozánětlivých cytokinů (Tagen et al., 2009)
<b>T lymfocyty</b>	Transport C4 metabolitů ven z mitochondrie (*předpoklad) Glykolýza (*předpoklad) Glutaminolýza (*předpoklad) Proliferace (Rupprecht et al., 2012)	Potenciál IMM a tvorba ROS (Vogler et al., 2006) Apoptóza (Chaudhuri et al., 2016) Produkce prozánětlivých cytokinů (*předpoklad)
<b>B lymfocyty</b>	Izotypový přesmyk na IgG (Cao et al., 2013)	Potenciál IMM a tvorba ROS (Kretschmar et al., 2016) Apoptóza (Cao et al., 2013)

V rámci vrozené imunity byla exprese UCP2 detekována v makrofázích, neutrofilech, dendritických buňkách a žírných buňkách. UCP2 v buňkách vrozené imunity negativně reguluje tvorbu mitochondriálních ROS a snižuje potenciál IMM. Důsledkem této regulace UCP2 zvyšuje kapacitu a dobu trvání fagocytózy, ale naopak snižuje migraci do místa zánětu (viz. Tabulka 1). Snižováním hladin ROS činí UCP2 buňky vrozené imunity méně účinné v boji s patogeny zejména kvůli nižšímu oxidativnímu vzplanutí a produkci prozánětlivých cytokinů prostřednictvím nižší aktivace NF- $\kappa$ B dráhy spolu se stavbou inflamasomu. Pro buňku je proto výhodné expresi tohoto proteinu po aktivaci snižovat a děje se tak prostřednictvím MAPK signalizace.

I v buňkách adaptivní imunity hraje UCP2 nemalou roli. Obdobně u nich reguluje hladiny ROS, a tím ovlivňuje signalizační dráhy MAPK a NFAT. Na rozdíl od makrofágů dochází po aktivaci u T lymfocytů ke zvyšování exprese UCP2. Jeho hladina musí být striktně regulována, neboť by v přítomnosti příliš velkého množství ROS mohlo dojít k apoptóze. UCP2 hraje klíčovou roli v lymfocytech zejména po jejich aktivaci, kdy se uplatňuje v regulaci metabolismu. Přesný mechanismus ještě není zcela objasněn, ale již nyní je jisté, že má tento protein co do činění s regulací klonální expanze, terminální diferenciací a apoptózy (viz. Tabulka 1). U B lymfocytů se UCP2 dále uplatňuje při humorální odpovědi, pravděpodobně pak při izotypovém přesmyku na IgG.

Zmíněné mechanismy regulace lze aplikovat i na řadu metabolických, autoimunitních a neurodegenerativních onemocnění. Tato práce popsala možné využití UCP2 při léčbě diabetes mellitus 1. typu, Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby a ulcerózní kolitidy. Ukazuje se, že zvýšení exprese UCP2 vede k protektivním účinkům a tlumení zánětlivého prostředí ve všech zmíněných onemocněních. Je toho mnoho, co o funkci UCP2 zatím nevíme. Již teď je ale patrné, že jeho uplatnění v imunitě je široké a výzkum v této oblasti může přinést slibné výsledky pro léčbu řady onemocnění.

## 7 Použité zdroje

- Andrews, Z.B., Horvath, B., Barnstable, C.J., Elseworth, J., Yang, L., Beal, M.F., Roth, R.H., Matthews, R.T., and Horvath, T.L. (2005). Uncoupling protein-2 is critical for nigral dopamine cell survival in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 25, 184–191.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Gubern, M., Surwit, R., et al. (2000). Disruption of the

- uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* *26*, 435–439.
- Asehnoune, K., Strassheim, D., Mitra, S., Kim, J.Y., and Abraham, E. (2004). Involvement of reactive oxygen species in toll-like receptor 4-dependent activation of NF- $\kappa$ B. *J. Immunol.* *172*, 2522–2529.
- Bai, Y., Onuma, H., Bai, X., Medvedev, A. V., Misukonis, M., Weinberg, J.B., Cao, W., Robidoux, J., Floering, L.M., Daniel, K.W., et al. (2005). Persistent nuclear factor- $\kappa$ B activation in Ucp2<sup>-/-</sup> mice leads to enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine production. *J. Biol. Chem.* *280*, 19062–19069.
- Basu Ball, W., Kar, S., Mukherjee, M., Chande, A.G., Mukhopadhyaya, R., and Das, P.K. (2011). Uncoupling protein 2 negatively regulates mitochondrial reactive oxygen species generation and induces phosphatase-mediated anti-inflammatory response in experimental visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* *187*, 1322–1332.
- Beck, V., Jaburek, M., Demina, T., Rupprecht, A., Porter, R.K., Jezek, P., and Pohl, E.E. (2007). Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. *FASEB J.* *21*, 1137–1144.
- Berardi, M.J., and Chou, J.J. (2014). Fatty acid flippase activity of UCP2 is essential for its proton transport in mitochondria. *Cell Metab.* *20*, 541–552.
- Berardi, M.J., Shih, W.M., Harrison, S.C., and Chou, J.J. (2011). Mitochondrial uncoupling protein 2 structure determined by NMR molecular fragment searching. *Nature* *476*, 109–114.
- Bhat, N.R., Feinstein, D.L., Shen, Q., and Bhat, A.N. (2002). p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells: Roles of nuclear factors, nuclear factor  $\kappa$ B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein- $\beta$ , and activating transcription factor-2. *J. Biol. Chem.* *277*, 29584–29592.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J.P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* *408*, 39–42.
- Brand, M.D., Pakay, J.L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D.C., Brookes, P.S., and Cornwall,

- E.J. (2005). The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem. J.* 392, 353–362.
- Cao, T., Dong, Y., Tang, R., Chen, J., Zhang, C.Y., and Zen, K. (2013). Mitochondrial uncoupling protein 2 protects splenocytes from oxidative stress-induced apoptosis during pathogen activation. *Cell. Immunol.* 286, 39–44.
- Cardoso, S.M., Santana, I., Swerdlow, R.H., and Oliveira, C.R. (2004). Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances A $\beta$  toxicity. *J. Neurochem.* 89, 1417–1426.
- Carrión, J., Abengoza, M.A., Fernández-Reyes, M., Sánchez-Martín, C., Rial, E., Domínguez-Bernal, G., and González-Barroso, M.M. (2013). UCP2 deficiency helps to restrict the pathogenesis of experimental cutaneous and visceral leishmaniasis in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–10.
- Chang, C., Curtis, J.D., Maggi, L.B., Faubert, B., Villarino, A. V., O'Sullivan, D., Huang, S.C.-C., van der Windt, G.J.W., Blagih, J., Qiu, J., et al. (2013). Posttranscriptional control of T Cell Effector function by aerobic glycolysis. *Cell* 153, 1239–1251.
- Chaudhuri, L., Srivastava, R.K., Kos, F., and Shrikant, P.A. (2016). Uncoupling protein 2 regulates metabolic reprogramming and fate of antigen-stimulated CD8<sup>+</sup> T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 869–874.
- Cechi, K., Voisine, P., Mathieu, P., Laplante, M., Bonnet, S., Picard, F., Joubert, P., and Richard, D. (2017). Functional characterization of the Ucp1-Associated oxidative phenotype of human epicardial adipose tissue. *Sci. Rep.* 7, 1–15.
- Chen, J., Chernatynskaya, A. V., Li, J.W., Kimbrell, M.R., Cassidy, R.J., Perry, D.J., Muir, A.B., Atkinson, M.A., Brusko, T.M., and Mathews, C.E. (2017). T cells display mitochondria hyperpolarization in human type 1 diabetes. *Sci. Rep.* 7, 1–11.
- \*Chen, J., Stimpson, S.E., Fernandez-Bueno, G.A., and Mathews, C.E. (2018). Mitochondrial reactive oxygen species and type 1 diabetes. *Antioxidants Redox Signal.* 29, 1361–1372.
- Conti, B., Sugama, S., Lucero, J., Winsky-Sommerer, R., Wirz, S.A., Maher, P., Andrews, Z., Barr, A.M., Morale, M.C., Paneda, C., et al. (2005). Uncoupling protein 2 protects dopaminergic neurons from acute 1,2,3,6-methyl-phenyl-tetrahydropyridine toxicity. *J. Neurochem.* 93, 493–501.

- Dawkins, M.J.R., and Scopes, J.W. (1965). Non-shivering thermogenesis and brown adipose tissue in the human new-born infant. *Nat. Publ. Gr.* *206*, 201–202.
- Dudek, N.L., Thomas, H.E., Mariana, L., Sutherland, R.M., Allison, J., Estella, E., Angstetra, E., Trapani, J.A., Santamaria, P., Lew, A.M., et al. (2006). Cytotoxic T-cells from T-cell receptor transgenic NOD8.3 mice destroy  $\beta$ -cells via the perforin and Fas pathways. *Diabetes* *55*, 2412–2418.
- Emre, Y., Hurtaud, C., Nübel, T., Criscuolo, F., Ricquier, D., and Cassard-Doulcier, A.M. (2007a). Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *Biochem. J.* *402*, 271–278.
- Emre, Y., Hurtaud, C., Karaca, M., Nubel, T., Zavala, F., and Ricquier, D. (2007b). Role of uncoupling protein UCP2 in cell-mediated immunity: How macrophage-mediated insulinitis is accelerated in a model of autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19085–19090.
- Ferris, S.T., Zakharov, P.N., Wan, X., Calderon, B., Artyomov, M.N., Unanue, E.R., and Carrero, J.A. (2017). The islet-resident macrophage is in an inflammatory state and senses microbial products in blood. *J. Exp. Med.* *214*, 2369–2385.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, Jo., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D., et al. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* *15*, 269–272.
- Friederich-Persson, M., Persson, P., Hansell, P., and Palm, F. (2018). Deletion of uncoupling protein-2 reduces renal mitochondrial leak respiration, intrarenal hypoxia and proteinuria in a mouse model of type 1 diabetes. *Acta Physiol.* *223*, 1–9.
- Gao, W., Wang, C., Yu, L., Sheng, T., Wu, Z., Wang, X., Zhang, D., Lin, Y., and Gong, Y. (2019). Chlorogenic acid attenuates dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice through MAPK/ERK/JNK pathway. *Biomed Res. Int.* *2019*, 1–13.
- Gasic, A.C., McGuire, G., Krater, S., Farhood, A.I., Goldstein, M.A., Smith, C.W., Entman, M.L., and Taylor, A.A. (1991). Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induces ICAM-1 and CD18-dependent neutrophil adherence. *Circulation* *84*, 2154–2166.
- \*Gloire, G., Legrand-Poels, S., and Piette, J. (2006). NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen

- species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* *72*, 1493–1505.
- Greiner, E.F., Guppy, M., and Brand, K. (1994). Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production. *J. Biol. Chem.* *269*, 31484–31490.
- Guo, Q., He, J., Zhang, H., Yao, L., and Li, H. (2020). Oleonic acid alleviates oxidative stress in Alzheimer's disease by regulating stanniocalcin-1 and uncoupling protein-2 signalling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *47*, 1263–1271.
- Gupta, A.K., Roy, S., and Das, P.K. (2021). Antileishmanial effect of the natural immunomodulator genipin through suppression of host negative regulatory protein UCP2. *J. Antimicrob. Chemother.* *76*, 135–145.
- Hanenberg, H., Kolb-Bachofen, V., Kantwerk-Funke, G., and Kolb, H. (1989). Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia* *32*, 126–134.
- Hilse, K.E., Kalinovich, A. V., Rupprecht, A., Smorodchenko, A., Zeitz, U., Staniek, K., Erben, R.G., and Pohl, E.E. (2016). The expression of UCP3 directly correlates to UCP1 abundance in brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1857*, 72–78.
- \*Himms-Hagen, J. (1990). Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J.* *4*, 2890–2898.
- Hoang, T., Smith, M.D., and Jelokhani-Niaraki, M. (2012). Toward understanding the mechanism of ion transport activity of neuronal uncoupling proteins UCP2, UCP4, and UCP5. *Biochemistry* *51*, 4004–4014.
- Hurtaud, C., Gelly, C., Chen, Z., Lévi-Meyrueis, C., and Bouillaud, F. (2007). Glutamine stimulates translation of uncoupling protein 2 mRNA. *Cell. Mol. Life Sci.* *64*, 1853–1860.
- Jabůrek, M., Vařecha, M., Gimeno, R.E., Dembski, M., Ježek, P., Zhang, M., Burn, P., Tartaglia, L.A., and Garlid, K.D. (1999). Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J. Biol. Chem.* *274*, 26003–26007.
- Ježek, J., Dlasková, A., Zelenka, J., Jabůrek, M., and Ježek, P. (2015). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated mitochondrial phospholipase iPLA<sub>2</sub>γ prevents lipotoxic oxidative stress in synergy with UCP2, amplifies signaling via G-protein-coupled receptor GPR40, and regulates insulin

- secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Antioxidants Redox Signal.* *23*, 958–972.
- Ježek, P., Modrianský, M., and Garlid, K.D. (1997). Inactive fatty acids are unable to flip-flop across the lipid bilayer. *FEBS Lett.* *408*, 161–165.
- \*Ježek, P., Holendová, B., Garlid, K.D., and Jabůrek, M. (2018). Mitochondrial uncoupling proteins: subtle regulators of cellular redox signaling. *Antioxidants Redox Signal.* *29*, 667–714.
- \*Kaplan, G.G., and Ng, S.C. (2017). Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *152*, 313–321.
- \*Kempuraj, D., Thangavel, R., Selvakumar, G.P., Zaheer, S., Ahmed, M.E., Raikwar, S.P., Zahoor, H., Saeed, D., Natteru, P.A., Iyer, S., et al. (2017). Brain and peripheral atypical inflammatory mediators potentiate neuroinflammation and neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* *11*, 1–16.
- \*Kikusato, M., Furukawa, K., and Toyomizu, M. (2016). Roles of mitochondrial oxidative phosphorylation and reactive oxygen species generation in the metabolic modification of avian skeletal muscle Roles of mitochondrial oxidative phosphorylation and reactive oxygen species generation in the metabolic modific. *Proc. Japan Soc. Anim. Nutr. Metab.* *60*, 57–67.
- Kim, J., Na, H., Kim, C., Kim, J., Ha, K., Lee, H., Chung, H., Jeong, H., Kwon, Y., and Kim, Y. (2008). The non-provitamin A carotenoid , lutein , inhibits NF-  $\kappa$  B-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase / PTEN / Akt and NF-  $\kappa$  B-inducing kinase pathways : Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NF- $\kappa$ B activation. *Free Radic. Biol. Med.* *45*, 885–896.
- Kretzschmar, C., Roof, C., Timmer, K., Sekora, A., Knübel, G., Escobar, H.M., Jaster, R., Müller, S., Fuellen, G., Köhling, R., et al. (2016). Uncoupling protein 2 deficiency results in higher neutrophil counts and lower B-cell counts during aging in mice. *Exp. Hematol.* *44*, 1085–1091.
- Kupersmidt, L., Amit, T., Bar-Am, O., Youdim, M.B.H., and Weinreb, O. (2012). The novel multi-target iron chelating-radical scavenging compound M30 possesses beneficial effects on major hallmarks of Alzheimer’s disease. *Antioxidants Redox Signal.* *17*, 860–877.



- Langston, J.W., Forno, L.S., Tetrud, J., Reeves, A.G., Kaplan, J.A., and Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann. Neurol.* *46*, 598–605.
- Larrouy, D., Laharrague, P., Carrera, G., Viguerie-Bascands, N., Levi-Meyrueis, C., Fleury, C., Pecqueur, C., Nibbelink, M., André, M., Casteilla, L., et al. (1997). Kupffer cells are a dominant site of uncoupling protein 2 expression in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *235*, 760–764.
- Lee, S., Moon, H., Kim, G., Cho, J.H., Lee, D.H., Dae-Hee, L., Ye, M.B., and Park, D. (2015). Anion transport or nucleotide binding by Ucp2 is indispensable for Ucp2-mediated efferocytosis. *Mol. Cells* *38*, 657–662.
- Li, X., Wang, G., Ding, G., and Liu, J. (2019). Increased UCP1 expression in the perirenal adipose tissue of patients with renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* *42*, 1972–1980.
- Liu, L., Dong, Y., Ye, M., Jin, S., Yang, J., Joosse, M.E., Sun, Y., Zhang, J., Lazarev, M., Brant, S.R., et al. (2017). The pathogenic role of NLRP3 inflammasome activation in inflammatory bowel diseases of both mice and humans. *J. Crohns. Colitis* *11*, 737–750.
- Lood, C., Blanco, L.P., Purmalek, M.M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S.S., Smith, C.K., Malech, H.L., Ledbetter, J.A., Elkon, K.B., and Kaplan, M.J. (2016). Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* *22*, 146–153.
- Ma, J., Yin, G., Lu, Z., Xie, P., Zhou, H., Liu, J., and Yu, L. (2018). Casticin prevents DSS induced ulcerative colitis in mice through inhibitions of NF- $\kappa$ B pathway and ROS signaling. *Phyther. Res.* *32*, 1770–1783.
- Mao, W., Yu, X.X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S.W., Adams, S.H., and Pan, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett.* *443*, 326–330.
- \*Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., and Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim. Biophys. Acta* *1504*, 82–106.
- Neurath, M.F., and Pettersson, S. (1997). Predominant role of NF- $\kappa$ B p65 in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation. *Immunobiology* *198*, 91–98.

- Nicholls, D.G., Bernson, V.S., and Heaton, G.M. (1978). The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Eff. Thermogenesis. Exp. Suppl.* 32, 89–93.
- Nübel, T., Emre, Y., Rabier, D., Chadefaux, B., Ricquier, D., and Bouillaud, F. (2008). Modified glutamine catabolism in macrophages of Ucp2 knock-out mice. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1777, 48–54.
- Papaccio, G., De Luca, B., and Pisanti, F.A. (1998). Macrophages and antioxidant status in the NOD mouse pancreas. *J. Cell. Biochem.* 71, 479–490.
- Park, D., Han, C.Z., Elliott, M.R., Kinchen, J.M., Trampont, P.C., Das, S., Collins, S., Lysiak, J.J., Hoehn, K.L., and Ravichandran, K.S. (2011). Continued clearance of apoptotic cells critically depends on the phagocyte Ucp2 protein. *Nature* 477, 220–224.
- Pecqueur, C., Alves-Guerra, M.C., Gelly, C., Lévi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F., and Miroux, B. (2001). Uncoupling Protein 2, in Vivo Distribution, Induction upon Oxidative Stress, and Evidence for Translational Regulation. *J. Biol. Chem.* 276, 8705–8712.
- Pfaff, E., and Klingenberg, M. (1968). Adenine nucleotide translocation of mitochondria, specificity and control. *Eur. J. Biochem.* 6, 66–79.
- Raho, S., Capobianco, L., Malivindi, R., Voza, A., Piazzolla, C., De Leonardis, F., Gorgoglione, R., Scarcia, P., Pezzuto, F., Agrimi, G., et al. (2020). KRAS-regulated glutamine metabolism requires UCP2-mediated aspartate transport to support pancreatic cancer growth. *Nat. Metab.* 2, 1373–1381.
- Raimbault, S., Dridi, S., Denjean, F., Lachuer, J., Couplan, E., Bouillaud, F., Bordas, A., Duchamp, C., Taouis, M., and Ricquier, D. (2001). An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem. J.* 353, 441–444.
- \*Rousset, S., Alves-Guerra, M.C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.M., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53, S130–S135.
- Rousset, S., Emre, Y., Join-Lambert, O., Hurtaud, C., Ricquier, D., and Cassard-Doulcier, A.M. (2006). The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate immunity.

Cytokine 35, 135–142.

- Rupprecht, A., Bräuer, A.U., Smorodchenko, A., Goyn, J., Hilse, K.E., Shabalina, I.G., Infante-Duarte, C., and Pohl, E.E. (2012). Quantification of uncoupling protein 2 reveals its main expression in immune cells and selective up-regulation during t-cell proliferation. *PLoS One* 7, 1–10.
- Rupprecht, A., Moldzio, R., Mödl, B., and Pohl, E.E. (2019). Glutamine regulates mitochondrial uncoupling protein 2 to promote glutaminolysis in neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1860, 391–401.
- Ryu, J.W., Hong, K.H., Maeng, J.H., Kim, J.B., Ko, J., Park, J.Y., Lee, K.U., Hong, M.K., Park, S.W., Kim, Y.H., et al. (2004). Overexpression of uncoupling protein 2 in THP1 monocytes inhibits  $\beta$ 2 integrin-mediated firm adhesion and transendothelial migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 864–870.
- Sailasuta, N., Harris, K., Tran, T., and Ross, B. (2011). Minimally invasive biomarker confirms glial activation present in Alzheimer’s disease: A preliminary study. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 7, 495–499.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Gubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Grégoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Lévi-Meyrueis, C., et al. (1998). 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.* 273, 34611–34615.
- Scantlebury, M., Lovegrove, B.G., Jackson, C.R., Bennett, N.C., and Lutermann, H. (2008). Hibernation and non-shivering thermogenesis in the Hottentot golden mole (*Amblysomus hottentottus longiceps*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 178, 887–897.
- Sena, L.A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., Hildeman, D.A., Wang, C.R., Schumacker, P.T., Licht, J.D., Perlman, H., et al. (2013). Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity* 38, 225–236.
- Shalit, F., Sredni, B., Brodie, C., Kott, E., and Huberman, M. (1995). T Lymphocyte subpopulations and activation markers correlate with severity of Alzheimer’s disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 75, 246–250.

- Silverman, A.J., Sutherland, A.K., Wilhelm, M., and Silver, R. (2000). Mast cells migrate from blood to brain. *J. Neurosci.* *20*, 401–408.
- De Simone, R., Ajmone-Cat, M.A., Pandolfi, M., Bernardo, A., De Nuccio, C., Minghetti, L., and Visentin, S. (2015). The mitochondrial uncoupling protein-2 is a master regulator of both M1 and M2 microglial responses. *J. Neurochem.* *135*, 147–156.
- Skoglund, G., Cotgreave, I., Rincon, J., Patarroyo, M., and Ingelman-Sundberg, M. (1988). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates CD11b/CD18-dependent cell adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *157*, 443–449.
- \*Song, J., Pfanner, N., and Becker, T. (2018). Assembling the mitochondrial ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 2850–2852.
- Sreedhar, A., Cassell, T., Smith, P., Lu, D., Nam, H.W., Lane, A.N., and Zhao, Y. (2019). UCP2 overexpression redirects glucose into anabolic metabolic pathways. *Proteomics* *19*.
- Tagen, M., Elorza, A., Kempuraj, D., Boucher, W., Kepley, C.L., Shirihai, O.S., and Theoharides, T.C. (2009). Mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits mast cell activation and reduces histamine content. *J. Immunol.* *183*, 6313–6319.
- Thangavel, R., Kempuraj, D., Zaheer, S., Raikwar, S., Ahmed, M.E., Selvakumar, G.P., Iyer, S.S., and Zaheer, A. (2017). Glia maturation factor and mitochondrial uncoupling proteins 2 and 4 expression in the temporal cortex of Alzheimer’s disease brain. *Front. Aging Neurosci.* *9*, 1–10.
- Thayer, T.C., Delano, M., Liu, C., Chen, J., Padgett, L.E., Tse, H.M., Annamali, M., Piganelli, J.D., Moldawer, L.L., and Mathews, C.E. (2011). Superoxide production by macrophages and T cells is critical for the induction of autoreactivity and type 1 diabetes. *Diabetes* *60*, 2144–2151.
- Tse, H.M., Milton, M.J., Schreiner, S., Profozich, J.L., Trucco, M., and Piganelli, J.D. (2007). Disruption of innate-mediated proinflammatory cytokine and reactive oxygen species third signal leads to antigen-specific Hyporesponsiveness. *J. Immunol.* *178*, 908–917.
- Vercesi, A.E., Martins, L.S., Silva, M.A.P., Leite, H.M.F., Cuccovia, I.M., and Chaimovich, H. (1995). PUMPing plants. *Nature* *375*, 24–24.
- Vogler, S., Pahnke, J., Rousset, S., Ricquier, D., Moch, H., Miroux, B., and Ibrahim, S.M. (2006). Uncoupling protein 2 has protective function during experimental autoimmune

encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* 168, 1570–1575.

Vorobjeva, N., Prikhodko, A., Galkin, I., Pletjushkina, O., Zinovkin, R., Sud'ina, G., Chernyak, B., and Pinegin, B. (2017). Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 96, 254–265.

Vozza, A., Parisi, G., De Leonardis, F., Lasorsa, F.M., Castegna, A., Amorese, D., Marmo, R., Calcagnile, V.M., Palmieri, L., Ricquier, D., et al. (2014). UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 960–965.

Wang, L., Wang, Y., Wang, Z., Qi, Y., Zong, B., Liu, M., Li, X., Zhang, X., Liu, C., Cao, R., et al. (2018). Growth differentiation factor 11 ameliorates experimental colitis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 315, G909–G920.

Winkler, E., and Klingenberg, M. (1994). Effect of fatty acids on H<sup>+</sup> transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* 269, 2508–2515.

Zhang, H., Kuai, X. yi, Yu, P., Lin, L., and Shi, R. (2012). Protective role of uncoupling protein-2 against dextran sodium sulfate-induced colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 27, 603–608.

Žáčková, M., Škobisová, E., Urbánková, E., and Ježek, P. (2003). Activating  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids and inhibitory purine nucleotides are high affinity ligands for novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J. Biol. Chem.* 278, 20761–20769.

**\*review jsou označeny hvězdičkou**

**Další použité zdroje:**

Vstup pro UCP2 v Protein Data Bank (online databáze) pod ID 2LCK. Dostupné z:

<https://www.rcsb.org/structure/2LCK>