

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze,  
Katedra buněčné biologie

## Diplomová práce



# Distribuce mitochondriálních odpráhujících proteinů ve vybraných tkáních myši a potkana

**Lukáš Alán**

Školitel: RNDr. Petr Ježek DrSc.

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky,

Oddělení biofyziky membránového transportu

2010

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Petra Ježka, DrSc. a jen s použitím citované literatury.

V Praze dne 30.4.2010

Lukáš Alán

Velmi děkuji RNDr. Petru Ježkovi, DrSc., stejně jako všem svým spolupracovníkům z laboratoře biofyziky membránového transportu, AV ČR v Praze, za odborné vedení a cenné rady a připomínky, díky kterým mohla tato práce vzniknout. Také bych chtěl poděkovat svým rodičům a prarodičům za podporu materiální, duševní a hlavně za to, že mi umožnili studovat.

# 1. Obsah

<b>1. Obsah</b>	<b>1</b>
<b>2. Seznam použitých zkratek</b>	<b>3</b>
<b>3. Abstrakt</b>	<b>5</b>
<b>4. Úvod</b>	<b>7</b>
<b>5. Mitochondrie</b>	<b>8</b>
5.1. <i>Mitochondriální anatomie a morfologie</i>	8
5.2. <i>Krebsův cyklus</i>	10
5.3. <i>Dýchací (elektrontransportní) řetězec</i>	11
5.4. <i>Odpřahující proteiny</i>	12
5.4.1. UCP1	14
5.4.2. UCP2	17
5.4.3. UCP3	21
5.4.4. UCP4	24
5.4.5. UCP5	24
<b>6. Metodika</b>	<b>27</b>
6.1. <i>Přístroje</i>	27
6.2. <i>Materiál</i>	27
6.2.1. Modelové organismy, kultivace	27
6.2.2. Chemikálie	28
6.3. <i>Protokoly</i>	29
6.3.1. Izolace celkové RNA z tkání	29
6.3.2. Izolace celkové RNA z buněk tkáňových kultur	29
6.3.3. Počítání buněk	30
6.3.4. Izolace mRNA z celkové RNA	30
6.4. <i>Gradientová PCR</i>	31
6.5. <i>Agarózová elektroforéza</i>	31
6.6. <i>Kvantitativní Real time PCR (qPCR)</i>	32
6.6.1. Princip Real time PCR	32

6.6.2.	Typy sond pro detekci PCR produktu	33
6.6.3.	Navržení primerů, prób a amplikonu	35
6.6.4.	Lightcycler Instrument 1.5	35
6.6.5.	Absolutní kvantifikace s externím standardem	36
6.6.6.	Provedení qPCR	36
6.6.7.	Charakterizace amplikonů	38
6.6.8.	Konstrukce kalibračních přímek	39
6.6.9.	Normalizace	40
6.6.10.	Statistické vyhodnocení	40
<b>7.</b>	<b>Výsledky</b>	<b>41</b>
7.1.	<i>Optimalizace kvantitativní PCR</i>	41
7.2.	<i>Kalibrační přímk</i>	42
7.3.	<i>Kvantifikace odpřahujících proteinů v jednotlivých tkáních myši a potkana</i>	43
7.3.1.	Bazální hladiny housekeeping genu GAPDH	44
7.3.2.	Bazální hladiny UCP2 mRNA	45
7.3.3.	Bazální hladiny UCP3 mRNA	46
7.3.4.	Bazální hladiny UCP4 mRNA	47
7.3.5.	Bazální hladiny UCP5 mRNA	48
7.3.6.	Srovnání bazálních hladin sumy odpřahujících proteinů	49
7.4.	<i>Vliv hladovění na expresi odpřahujících proteinů u ucp2 -/- myši</i>	50
7.4.1.	Efekt hladovění na expresi UCP3 u ucp2 -/- a kontrolních myši	51
7.4.2.	Efekt hladovění na expresi UCP4 u ucp2 -/- a kontrolních myši	52
7.4.3.	Efekt hladovění na expresi UCP5 u ucp2 -/- a kontrolních myši	53
7.4.4.	Efekt hladovění na expresi UCP2 u ucp2 -/- a kontrolních myši	54
7.4.5.	Souhrn exprese genů ucp3, ucp4 a ucp5 před a po hladovění	55
7.5.	<i>Změna exprese UCP2 vlivem sníženého parciálního tlaku O<sub>2</sub> v kultivační atmosféře</i>	55
<b>8.</b>	<b>Diskuze</b>	<b>58</b>
8.1.	<i>Kvantifikace bazálních hladin UCP mRNA vybraných tkání myši a potkana</i>	58
8.2.	<i>Kvantifikace UCP mRNA hladin po hladovění ucp2 -/- myši</i>	61
8.3.	<i>Vliv parciálního tlaku kyslíku na transkripci ucp2 v pankreatických beta buňkách</i>	63
<b>9.</b>	<b>Závěr</b>	<b>65</b>
<b>10.</b>	<b>Seznam literatury</b>	<b>66</b>

## 2. Seznam použitých zkratek

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

TOM	Translokáza vnější mitochondriální membrány
TR-β	Receptor thyroïdních hormonů
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina
UCP	Odpřahující protein

### 3. Abstrakt

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

Tato práce za použití metody RT-PCR odhalila rozdíly v tkáňových expresních profilech odpřahujících proteinů v modelových organizmech myši a potkana. Signifikantní rozdíly v transkripcích UCP mezi tkáněmi myši a potkana byly nalezeny v tkáních plic, mozku a svalu, vždy ve prospěch myších tkání. V případě plic je rozdíl dán vyšší transkripcí *ucp2*. V myším mozku je tento rozdíl dán transkripcí *ucp4* i *ucp5* a konečně ve svalu myši za tímto rozdílem stojí UCP3 mRNA. Dále bylo řešeno, zda na transkripční úrovni dochází ke komplementaci UCP2 v tkáních sleziny a plic u *ucp2* *-/-* myši. Výsledkem však bylo, že ani po hladovění nedochází v takto modifikovaném organismu ke zvýšené transkripci některého ze zkoumaných UCP. V poslední části projektu byla zjištěna závislost transkripce *ucp2* inzulinomových INS-1E buněk na množství kyslíku v kultivační atmosféře.

Klíčová slova:

Odpřahující protein, UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, UCP5, mitochondrie, ROS, tkáňová distribuce, hladovění, glukózou stimulovaná sekrece inzulínu



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

This thesis showed differences in tissue transcription pattern between rat and mice using RT-PCR absolute quantification. Significant differences in pattern were found in lungs, brain and muscle. In each case UCP expression was higher in mice tissues. Mice lungs express mainly UCP2. The difference in mice brain is caused by ucp4 and ucp5 genes transcription and finally in muscle is highest content of UCP3 mRNA. We investigated whether any of ucp transcript can complement ucp2 transcript in spleen or lungs of ucp2 <sup>-/-</sup> mice. We did not find any difference which can explain, that in isolated lung mitochondria of fasted ucp2 <sup>-/-</sup> mice were uncoupled in state 4. In the last project, we found relationship between ucp2 transcription in insulinoma INS-1E cells and oxygen levels of the cultivation atmosphere.

Key words:

Uncoupling protein, UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, UCP5, mitochondria, ROS, tissue distribution, food restriction, glucose stimulated insulin secretion

## 4. Úvod

Všechny živé organizmy vyžadují zdroj energie, kterou konvertují na chemickou energii anhydridových vazeb v molekulách adenosintrifosfátu (ATP), univerzálního buněčného energetického mediátoru. Tato energie pak slouží k růstu, dělení a ochraně před nepříznivými vnějšími vlivy. V eukaryotických buňkách, pro něž je charakteristická kompartmentalizace metabolických procesů, je naprostá většina ATP produkována v mitochondriích. Tyto semiautonomní organely, ohraničené dvojitou membránou, slouží nejen jako centrum katabolických drah, ale hrají také významnou roli v procesech buněčné signalizace, především v regulaci koncentrace vápenatých iontů, produkce superoxidu a iniciaci buněčné smrti – apoptózy. Aktivita mitochondrií moduluje celkový energetický výdej, tělesnou hmotnost a produkci tepla. V lidském organismu doprovází mitochondriální dysfunkce významné patologické stavy, především vznik a rozvoj diabetu, aterosklerózy, hypertenze, neurodegradativních chorob a dokonce i nádorových onemocnění či stárnutí.

Sekvenací genomů různých organismů byla umožněna analýza otevřených čtecích rámců (ORF), díky kterým bylo nalezeno mnoho nových proteinů s neznámou funkcí. Byly analyzovány proteinové rodiny na základě sekvenční homologie, mezi jinými i rodina mitochondriálních aniontových přenašečů (MACP), která se u člověka skládá ze 47 různých proteinů. Touto cestou byly postupně identifikovány čtyři „nové“ odpráhuující proteiny se sekvenční homologií s do té doby jediným známým odpráhuujícím proteinem - termogeninem (dnes odpráhuující protein 1 – UCP1). UCP1 je protein exprimovaný především v hnědé tukové tkáni, kde je jeho funkcí odpražení oxidativní fosforylace od transportu elektronů a následné uvolnění tepla cestou netřesové termogeneze. Bohužel fyziologická funkce nově objevených proteinů není ani po deseti letech intenzivního výzkumu jednoznačně potvrzena. Bylo však vysloveno několik hypotéz nastiňujících jejich možné role v buněčné fyziologii; například snižování produkce reaktivních sloučenin, účast na netřesové termoregulaci, regulace tělesné váhy, regulace inzulinové sekrece atd.

Společně s odhalováním funkce odpráhuujících proteinů probíhají studie tkáňové distribuce a porovnávání hladin těchto proteinů v jednotlivých tkáních. Bylo publikováno mnoho prací o výskytu mRNA a proteinu jednotlivých izoform odpráhuujících proteinů v různých tkáních. Chybí však shrnutí těchto studií a také kvantitativní porovnání hladin odpráhuujících proteinů mezi sebou.

Cílem diplomové práce bylo ověření následujících otázek:

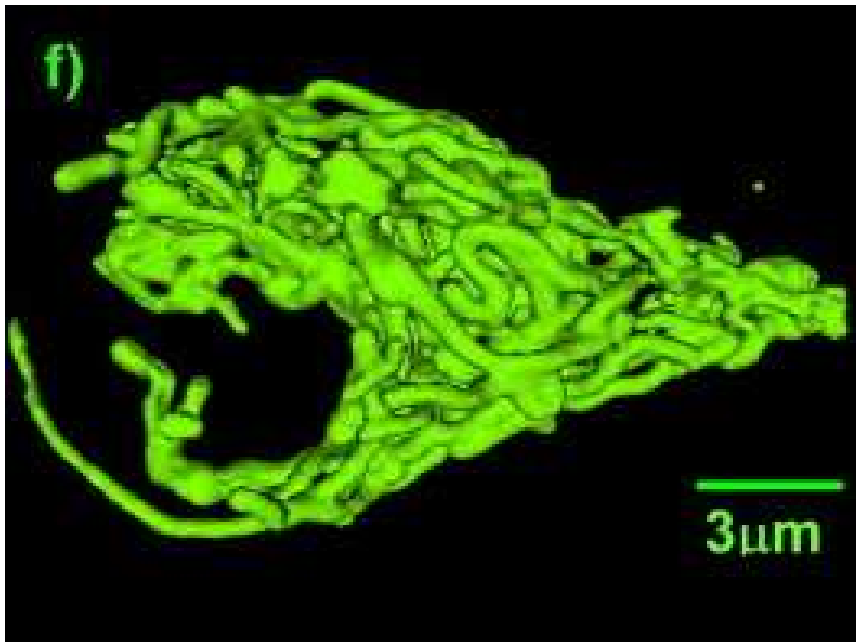
- ❑ Liší se od sebe modelové organismy potkana a myši na úrovni transkripce mRNA odpráhuujících proteinů UCP2, UCP3, UCP4 a UCP5?
- ❑ Nahrazuje expresi UCP2 mRNA u *ucp2 knockout* myši po stimulaci hladověním některý ze zbylých odpráhuujících proteinů?
- ❑ Dochází ke změnám v transkripci UCP2 mRNA v pankreatických beta buňkách při změnách procentuálního zastoupení kyslíku v kultivační atmosféře?

## 5. Mitochondrie

Mitochondrie jsou semiautonorní organely, vyskytující se u eukaryotických organismů. Ve většině buněk se za fyziologických podmínek nachází ve formě tzv. mitoretikula (viz kapitola 5.1). Jejich původ není zcela znám, ale podle endosymbiotické teorie se odhaduje, že vznikly fagocytózou bakteriální buňky. Hlavní funkcí mitochondrie je zajišťovat fungování energetického metabolismu buňky. Účastní se mnoha dalších buněčných procesů, např. signálních kaskád, buněčného cyklu a buněčného růstu. Jako semiautonorní organely si mitochondrie ponechaly část DNA. Počet kopií této DNA závisí na druhu organismu, buněčném typu, ontogenetickém stádiu a pohybuje se řádově v rozmezí několika jednotek až statisíců kopií. U člověka jsou v mitochondrii kódovány dvě rRNA, 22 tRNA a 13 proteinů dýchacího řetězce a celková velikost mtDNA je 16,6 *kbp*. Obecně je však velikost mitochondriálního genomu různá a nemusí nutně korespondovat s počtem genů kódovaných mtDNA. U rostlin může dosahovat velikost mtDNA až 366,9 *kbp*, zatímco některé houby mají pouze 20 *kbp*.

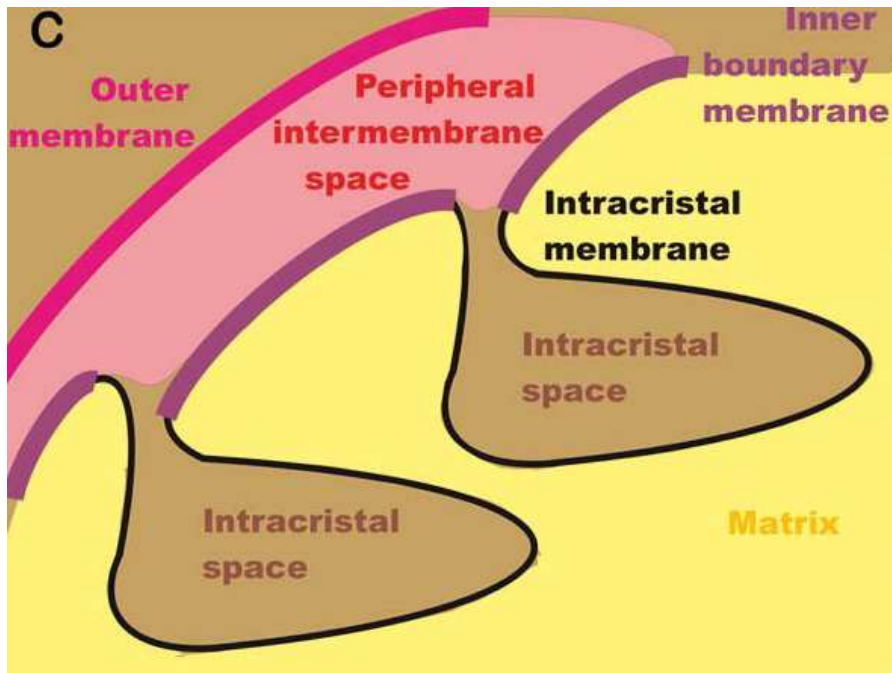
### 5.1. Mitochondriální anatomie a morfologie

Velikost a tvar mitochondrií jsou značně proměnlivé v závislosti na jejich původu a metabolickém stavu. První obrázky z elektronového mikroskopu ukazovaly mitochondrie jako organely ledvinovitého tvaru (*Hackenbrock, 1966*). Současné poznatky posunuly představu o tvaru mitochondrie do podoby kontinuální sítě - mitoretikula, které se může rozpadat na menší části nebo zpětně fúzovat. Tyto děje jsou popsány v review Benard a Karbowski 2009 (*Benard a Karbowski, 2009*). Na obrázku č.1 je fotografie matrix mitochondriálního retikula vytvořená technologií 4Pi mikroskopie, která vystihuje současnou představu o tvaru mitochondrií.



obrázek 1: Mitochondriální retikulum potkaní inzulinomové buňky INS-1E, transfekované GFP proteinem cíleným do matrix (Převzato z Plecita-Hlavata et al., 2008).

Mitochondrie je složena z jednotlivých kompartmentů, majících specifické funkce. Jsou to vnější membrána, mezimembránový prostor, vnitřní membrána a matrix. Vnější mitochondriální membrána obklopuje celou organelu a má stejný hmotnostní poměr proteinů a fosfolipidů jako eukaryotická plazmatická membrána. Obsahuje velké množství integrálních proteinů, tzv. porinů, které umožňují průchod molekulám do 10000 Da. Větší proteiny procházejí pomocí multipodjednotkových proteinů typu TOM (translocase of outer membrane) a své signální sekvence. Mezimembránový prostor má díky vysoké permeabilitě vnější membrány podobné složení jako cytosol. Vnitřní mitochondriální membrána obsahuje proteiny čtyř funkčních typů. Jsou to proteiny respiračního řetězce, ATP syntáza, specifické transportní proteiny regulující výměnu metabolitů s matrix a translokační komplex (TIM) pro import nascentních proteinů. Vnitřní mitochondriální membrána tvoří množství invaginací, zvaných kristy. Kristy zvyšují 3-5 násobně povrch vnitřní membrány a poskytují tak více prostoru pro membránové proteiny dýchacího řetězce, které jsou soustředěné právě v těchto místech (Obrázek č.2).



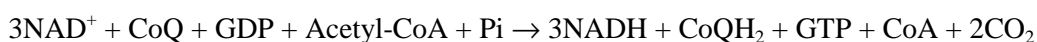
obrázek 2: Kristy vnitřní mitochondriální membrány (Převzato z Jezek et al., 2010b)

Nejdůležitějším lipidem vnitřní membrány je fosfolipid kardiolipin, který má ve svém strukturním vzorci čtyři mastné kyseliny (MK) a výrazně přispívá k nepropustnosti membrány. Vzniká tak regulovatelná bariéra, propustná pro většinu iontů, metabolitů a nízkomolekulárních sloučenin. Důsledkem existence této bariéry je prostorové oddělení metabolických dějů mezi cytosolem a mitochondriemi. Vnitřní membrána také udržuje koncentrační gradienty těchto látek, především však protonový, který je esenciální pro tvorbu ATP v procesu oxidativní fosforylace.

Matrix je prostor uzavřený vnitřní membránou obsahující asi 2/3 všech mitochondriálních proteinů. Nalezneme zde například enzymy Krebsova cyklu, enzymy zpracovávající pyruvát a aktivované mastné kyseliny, speciální mitochondriální ribozomy, t-RNA a mitochondriální DNA.

## 5.2. Krebsův cyklus

Krebsův cyklus je významným uzlem sítě buněčných metabolických drah. Končí jím oxidace většiny cukrů, mastných kyselin i aminokyselin a slouží k tvorbě čtených metabolických prekurzorů. Tyto látky vstupují do Krebsova cyklu poté, co jsou katabolickými dráhami přeměněny na acetyl-CoA. Ten kondenzuje s oxalacetátem v reakci katalyzované enzymem citrátsyntázou za vzniku kyseliny citronové, která už je součástí dalších reakcí Krebsova cyklu. Stechiometrie odbourávání acetylové skupiny v Krebsově cyklu je:



Jedna acetylová skupina je tedy oxidována na dvě molekuly  $\text{CO}_2$ , přičemž vzniká energeticky bohatá molekula GTP a 4 vodíkové ekvivalenty, tři ve formě NADH a ve formě redukovaného

koenzymu Q (ubichinolu). Vzniklá redukční činidla s vysokým záporným oxidoredukčním potenciálem slouží jako substráty pro enzymy dýchacího řetězce.

Krebsův cyklus je navíc provázán s dýchacím řetězcem přímo enzymem sukcinát dehydrogenázou. Tento komplex katalyzuje konverzi sukcinátu na malát za současného uvolnění elektronů. Vzniklé elektrony jsou vázány na FAD prostetickou skupinu sukcinát dehydrogenázy. Reoxidace je zajištěna přenosem elektronů na koenzym Q dýchacího řetězce.

Sukcinát dehydrogenáza a další enzymy Krebsova cyklu jsou kódovány jadernou DNA.

### 5.3. Dýchací (elektrontransportní) řetězec

V dýchacím řetězci dochází k přenosu elektronů z NADH na komplex I (NADH dehydrogenáza) a ze sukcinátu na komplex II (sukcinát:ubichinon-oxidoreduktáza). Z těchto komplexů jsou elektrony přeneseny koenzymem Q na komplex III (koenzym Q – cytochrom c oxidoreduktáza) a dále cytochromem c na komplex IV (cytochrom c oxidáza), kde jsou 4 elektrony použity k redukci O<sub>2</sub> na dvě molekuly vody.

Zatímco elektrony procházejí redoxně aktivními jednotkami jednotlivých komplexů, dochází k transportu H<sup>+</sup> z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Vzniká tak protonový gradient na vnitřní mitochondriální membráně, tzv. protonmotivní síla. Ta je podle Mitchellovy chemiosmotické teorie spřažena se syntézou ATP. F<sub>0</sub> podjednotka mitochondriální ATPázy využívá zpětný tok protonů, který je převeden na rotaci podjednotky γ F<sub>1</sub> komplexu což způsobí konformační změny dalších podjednotek. Tyto změny potom zajišťují tvorbu ATP z ADP a Pi.

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

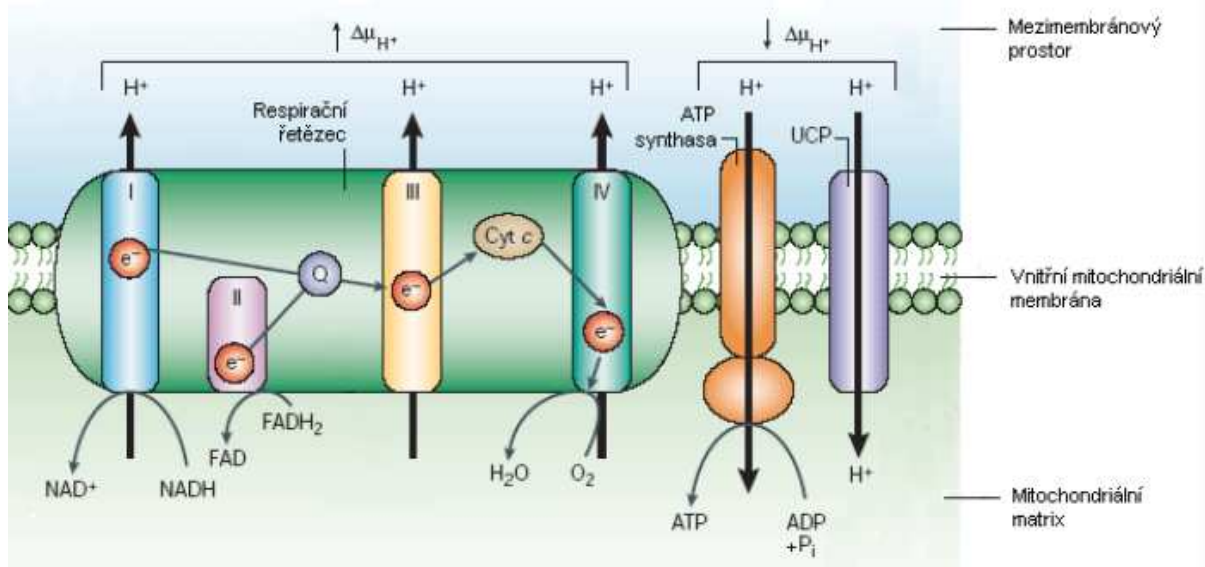
$$\Delta p = \frac{\Delta\mu_{H^+}}{F} = \Delta\Psi_m - 59\Delta pH_m \text{ [mV]},$$

kde F je Faradayova konstanta,  $\Delta\Psi_m$  membránový potenciál a  $\Delta pH_m$  rozdíl koncentrace protonů na membráně. Maximální protonmotivní síly je dosaženo v tzv. stavu IV za absence syntézy ATP a zpětného toku H<sup>+</sup>. Ke snížení protonmotivní síly dochází ve stavu III, kdy je v mitochondrii spřažena oxidace s fosforylací. V tomto stavu, kdy probíhá oxidativní fosforylace, je část  $\Delta p$  využívána pro syntézu ATP. Respirační kontrolou je nazýván mechanismus, kdy vyšší  $\Delta p$  zabraňuje dalšímu pumpování H<sup>+</sup>. Tím je zpětnovazebně snížena respirace. Podmínkou spřažení transportu elektronů a syntézy ATP je nepropustnost vnitřní mitochondriální membrány. Existují však látky s protonoforickou aktivitou, tzv. odpřahovače, které zvyšují propustnost membrány pro H<sup>+</sup> ionty. Způsobí tím odpřažení transportu elektronů od následné syntézy ATP a tím disipaci energie na teplo, protože zpětný tok H<sup>+</sup> se neuskutečňuje ATP-syntázou, ale probíhá mimo ni. Klasickými odpřahovači jsou např. 2,4-dinitrofenol a karbonylkyanid-*p*-trifluoromethoxyfenylhydrazon.

Během oxidativní fosforylace nevzniká pouze ATP a voda, ale neúplnou redukcí kyslíku na komponentách dýchacího řetězce je produkován i tzv. superoxidový aniont  $O_2^{\bullet-}$  radikál obsahující nespárovaný elektron. Ačkoliv je vytvářen v malé míře, (<1% prodýchaných kyslíkových molekul) podílí se na vzniku dalších radikálů a peroxidů (hydroperoxylový radikál  $HO_2^{\bullet}$ , hydroxylový radikál  $^{\bullet}OH$ , uhličitanový aniont  $HCO_3^{\bullet-}$  atd.). Vzniká např. autooxidací ubisemichinonového radikálu na komplexu III (Jezek a Hlavata, 2005). S vyšším potenciálem na membráně se vytváří více superoxidu. Tato skutečnost je dána tím, že pomalejší tok elektronů umožňuje vyšší poločas života přechodných radikálů a tím zvýší jejich šanci na reakci s kyslíkem. Proto při syntéze ATP i odpřažení je tvorba superoxidu snížena. Ve stavu IV, kdy je respirace limitována nedostatkem ADP a membránový potenciál je vysoký, je tvorba superoxidu maximální. Superoxid je dismutován superoxiddismutázou (SOD) v matrix (MnSOD) a v mezimembránovém prostoru (CuZnSOD) na peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  volně difunduje přes membrány a může být zdrojem dalších reaktivnějších intermediátů, jako je např. hydroxylový radikál  $^{\bullet}OH$ . (Jezek a Hlavata, 2005).

## 5.4. Odpráhující proteiny

V průběhu fylogeneze se vyvinuly proteiny se schopností zprostředkovat výsledný elektroforetický přenos  $H^+$ . Slouží tak jako regulovatelné odpráhovače a mohou za jistých podmínek fyziologicky odpráhat mitochondrie *in vivo* a tím disipovat energii.



obrázek 3: Oxidativní fosforylace (Převzato z Krauss et al., 2005)

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

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

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

Proteiny z rodiny UCP, na rozdíl od některých jiných jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů, postrádají odštěpitelný mitochondriální importní signál. Informace o jejich určení je v první smyčce směřující do matrix. Ta při vstupu do mitochondrie interaguje s Tom20 (translocase of the outer mitochondrial membrane 20), receptor importního komplexu vnější mitochondriální membrány. Druhá mitochondriální smyčka také disponuje vazebným místem pro Tom20 a je nepostradatelná i pro inzerci proteinu do vnitřní mitochondriální membrány (Schleiff a McBride, 2000).

Odpřahující proteiny se pravděpodobně vyvinuly z anion/anionových nebo anion/nukletidových přenašečů ještě před divergencí eukaryot na živočichy, rostliny a houby. Jako vývojově nejstarší se jeví savčí izoforma UCP4, jelikož je velmi příbuzná rostlinnému UCP3 u *Arabidopsis thaliana*. Příbuznost je zjevná i s odpřahujícími proteiny nalezenými u *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* a hlenky *Dictyostelium discoideum*. Fylogenetické analýzy naznačují, že se rodina odpřahujících proteinů skládá z pěti podrodin. Jsou to savčí podrodiny I (UCP1, UCP2, UCP3) a IV (UCP5), rostlinné

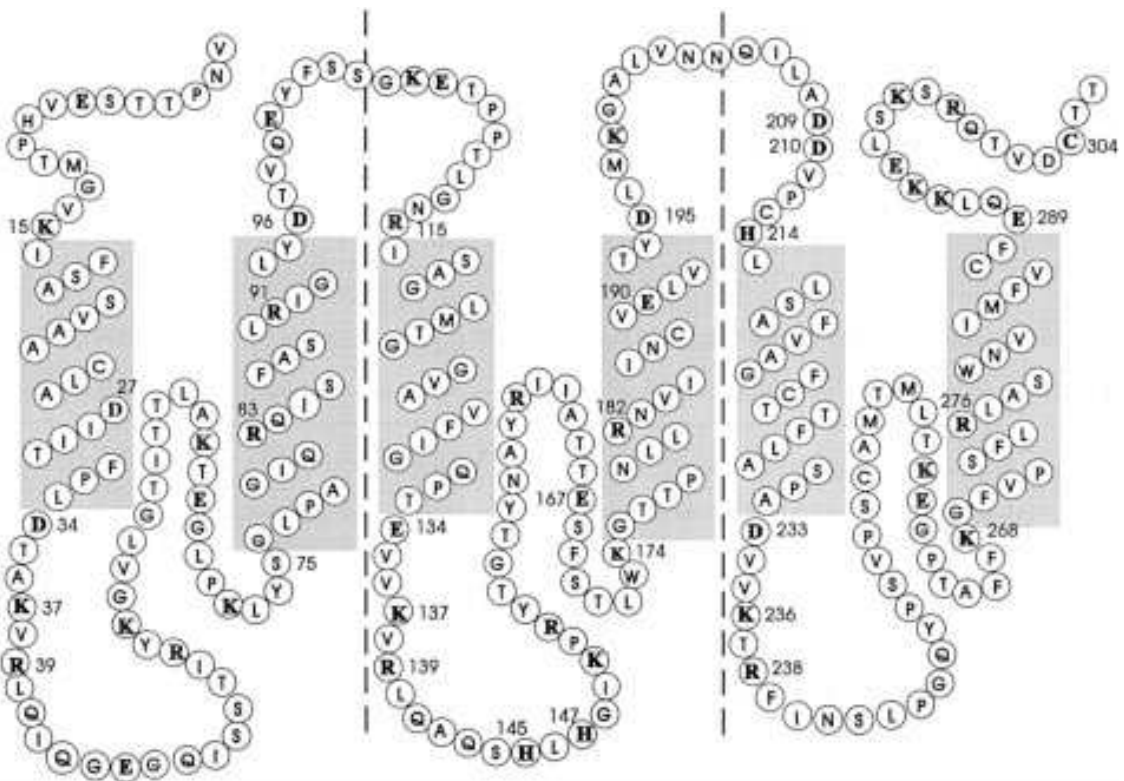


podrodiny UCP/PUMP podrodiny II a V, a pravděpodobně původní podrodina III (UCP4) (Nogueira et al., 2005).

## 5.4.1. UCP1

### 5.4.1.1. Struktura

Pochopení netřesové termoregulace, probíhající v savčí hnědé tukové tkáni (BAT) vedlo k potvrzení Mitchellovy chemiosmotické teorie a k objevení nového proteinu s odpřahující funkcí, UCP1. Jeho gen je lokalizován na lidském chromozomu č. 4 a v genomu myši se nachází na chromozomu č. 8. V aktivní formě se pravděpodobně vyskytuje jako dimer. Molekulová hmotnost monomeru je 33 kDa. UCP1 se exprimuje především v BAT, kde představuje až 14% celkového množství proteinů vnitřní mitochondriální membrány (Cannon a Nedergaard, 2004).



obrázek 4: Primární a sekundární struktura UCP1 z hnědé tukové tkáně křečka (Převzato z Klingenberg, 1999)

### 5.4.1.2. Regulace aktivity

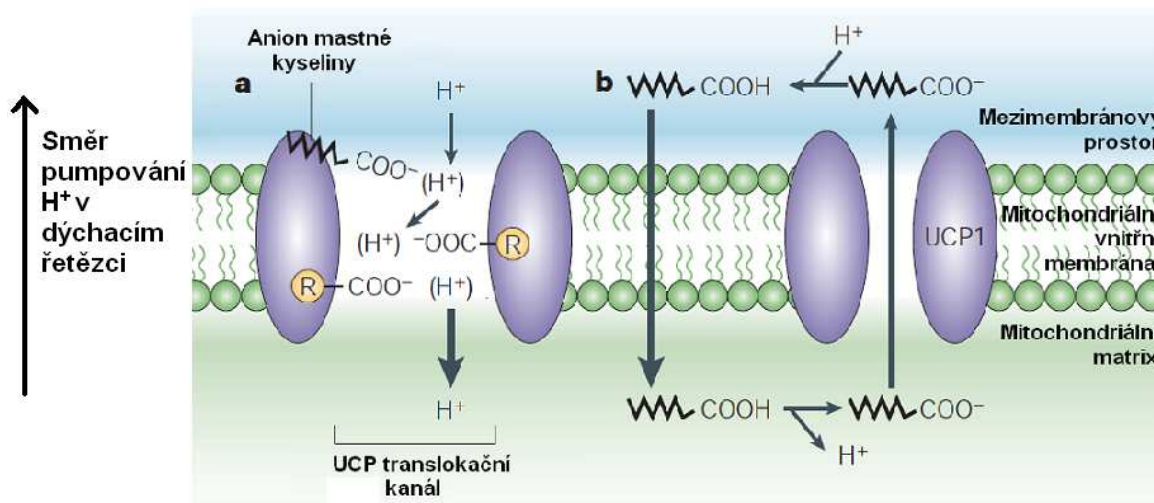
Aktivita UCP1 je regulována sympatickým nervovým systémem. Stimulace  $\beta$ -adrenergních receptorů katecholaminy koordinuje buněčnou odpověď, která má dvě fáze. V první z nich je přes receptor asociovaný s G-proteinem aktivovaná adenylátcykláza, která produkuje cAMP. cAMP dále aktivuje hormon-senzitivní fosfolipázu, která uvolňuje mastné kyseliny z cytoplazmatické membrány. Mastné kyseliny mohou sloužit jako substrát nebo jako kofaktor UCP1 (viz dále). Druhá fáze spočívá

ve zvýšeném transportu a oxidaci energetických zdrojů, které vedou k tvorbě redukčních agens důležitých pro tvorbu protonového gradientu. Inhibitory jsou purinové nukleosid di- a trifosfáty (ADP, GDP, ATP, GTP), které se s vysokou afinitou váží na nukleotid-vazebné místo UCP1 na cytosolické straně vnitřní mitochondriální membrány (Krauss *et al.*, 2005).

#### 5.4.1.3. Mechanismus odpřažení

Mastné kyseliny (MK) tedy hrají při odpřažení hlavní roli, kterou se pokoušejí vysvětlit dva rozdílné modely. Jedna z hypotéz, tzv. protony-pufřující model, považuje MK za prostetické skupiny pro UCP1. Předpokladem je, že UCP proteiny mají translokační kanál, skrz který protony vstupují zpět do mitochondriální matrix. Protony se pohybují kanálem přeskoky přes záporně nabitě aminokyseliny, které se nacházejí v kritických místech kanálu. Funkcí MK by měl být import protonů k translokačnímu kanálu a jejich přenos na aminokyseliny (Klingenberg, 1999). Přesný mechanismus však zůstává neznámý. Nicméně hlavní myšlenkou zůstává přechod protonů skrz kanál odpřahujícího proteinu.

Druhá hypotéza (model cyklování mastných kyselin) předpokládá schopnost protonovaných MK procházet samovolně membránou a vstupovat do matrix, kde se deprotonují a vrací se přes UCP1 zpět do mezimembránového prostoru. Tento transport MK přes UCP1 je řízen membránovým potenciálem a UCP1 zde působí jako flipáza, kdy společně s mastnými kyselinami vytváří protonoforetický cyklus, který snižuje oxidoredukční energii na vnitřní membráně mitochondrie (Skulachev, 1991).



obrázek 5: Dva modely translokace  $H^+$  pomocí volných mastných kyselin a UCP1. a – protony pufřující model, b – model cirkulace mastných kyselin (Převzato z Krauss *et al.*, 2005)

#### 5.4.1.4. Regulace transkripce UCP1

V myším genu *ucp1* se nachází asi 200 bp dlouhý „enhancer element“ 2,3 - 2,5 kb před transkripčním počátkem. Podobný element se nachází také u potkana a člověka. V tomto místě se váže řada transkripčních faktorů z rodiny jaderných receptorů, zahrnující receptor  $\gamma$  stimulující proliferaci peroxizomů (PPAR $\gamma$ ), retinoidní X receptor (RXR) a thyroideální receptor (Lengacher *et al.*, 2004). Jejich

ligandy jsou syntetické thiazoledinediony, retinoidy a trijodthyronin. V současné době jsou známy 4 mechanismy prokazující noradrenergní stimulaci transkripční aktivity UCP1 enhanceru v diferenciované buňce hnědé tukové tkáně. Noradrenální stimulace vyvolává odpověď v podobě rychlého vzrůstu fosforylovaných pCREB (cAMP response element binding proteins) (Thonberg *et al.*, 2002). Rim a Kozak objevili, že se pCREB váže jako homodimer na CRE2 místo v UCP1 enhancerové sekvenci a aktivuje tak transkripci (Rim a Kozak, 2002). Jako druhý mechanismus noradrenergní transkripční aktivace je vazba jaderného faktoru (NFE212) na NF-E2 místo v enhanceru. NFE212 je také aktivován cestou závislou na cAMP. Další dva mechanismy opět vycházejí z cAMP. Jejich transkripční faktory jsou dejodináza typu 2 (DIO-2) a PPAR $\gamma$  koaktivátor (PGC-1). Vystavení chladu způsobí noradrenergní stimulaci DIO-2 aktivity a vzrůst syntézy trijodthyroninu, který stimuluje aktivitu thyroidních receptorů  $\beta$  (TR $\beta$ ) v UCP1 enhanceru. Současně se zvyšuje exprese PGC-1, který se účastní iniciace transkripce společně s komplexy jaderných transkripčních faktorů PPAR  $\gamma$ /RXR $\alpha$  a TR $\beta$ /RXR $\alpha$  v UCP1 promotoru (Klingenspor, 2003).

#### 5.4.1.5. UCP1 a fyziologie buňky

UCP1 je tedy nejvíce exprimován v BAT, kde má nezastupitelnou úlohu v netřesové termogenezi. Tento fakt byl dokázán na transgenních *ucp1* *-/-* myších, které po vystavení teplotě 4° C trpěly těžkou hypotermií (Enerback *et al.*, 1997). Kromě toho vede fenotyp *Ucp1* *-/-* k rozvoji obezity (Lowell *et al.*, 1993). UCP1 je v BAT exprimován v množství dosahujícím exprese housekeeping genů. Poměr mezi UCP1 a ATPázou je ve vnitřní mitochondriální membráně buněk hnědé tukové tkáně roven 1:1 (Cannon a Nedergaard, 2004). Žádný jiný odpráhuující protein ani zdaleka nedosahuje takových hodnot exprese. Např. množství UCP3 je ve svalu (tkáň s jednoznačně nejvyšší expresí *ucp3* u myši) asi 200x až 700x nižší než množství UCP1 v BAT (Mattiasson a Sullivan, 2006).

Hladovění a omezení potravy obecně vede ke snížení rychlosti metabolismu a následně ke zvýšení metabolické účinnosti. V hnědé tukové tkáni dochází při hladovění k inhibici její aktivity a také ke snížení množství UCP1. Snížení exprese UCP1 je v tomto případě způsobeno signalizací sympatiku (Young *et al.*, 1982). Termogenní funkce UCP1 v BAT je také aktivována hladinou leptinu v krvi. Předpokládá se, že v hypotalamu jsou situovány receptory pro leptin, které zde stimulují ventromediální hypotalamické jádro zodpovědné za aktivaci BAT a UCP1 (Dhillon *et al.*, 2001)

#### 5.4.1.6. Distribuce UCP1

První odpráhuující protein je exprimován především v hnědé tukové tkáni, kde plní svou hlavní funkci - tvorbu tepla při netřesové termogenezi. Nedávno byl tento protein objeven i v buňkách lidské pokožky a jejich buněčných derivátech. (Mori *et al.*, 2008) a v buňkách brzlíku (Adams *et al.*, 2008). *Ucp1* mRNA byla v malém množství nalezena také v lidské mozku a v kosterním svalu (Lengacher *et al.*, 2004).

## 5.4.2. UCP2

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

Myší gen *ucp2* má délku přibližně 6,3 kb a obsahuje osm exonů a sedm intronů. Promotor se nachází ve vzdálenosti 369 bází před iniciačním kodónem a postrádá TATA a CAAT boxy, je však bohatý na GC páry. Tato promotorová oblast by měla podporovat nasedání iniciačních faktorů transkripce, jako jsou Sp1, AP-2, AP-1, CREB, MyoD a glukokortikoidní elementy – GRE. Sekvenční analýza 3' konce potom odhalila polyadenylační signál (ATAAA) ve vzdálenosti 257 bp za stop kodónem (Yamada et al., 1998).

### 5.4.2.1. Regulace transkripce

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

Jedním z regulátorů transkripce druhého odpráhuujícího proteinu je leptin. Je to 16 kDa velký hormon peptidové povahy, který hraje klíčovou úlohu v energetickém metabolismu organismu. Je syntetizovaný a sekretován adipocyty, placentou, trávicím traktem a kosterním svalstvem. Množství leptinu v krevní plazmě je závislé na tělesné hmotnosti, množství tuku, pohlaví (u žen je jeho syntéza dvakrát vyšší než u mužů) a výdeji energie. Ve většině případů obezity je hladina leptinu vysoká.

Primární úlohou leptinu je tedy zprostředkovat hypotalamu informaci o množství tuku v těle a ovlivnit funkce centrálního nervového systému, které regulují příjem potravy a výdej energie. Působení leptinu na buňku je zprostředkováno transmembránovými receptory (obR) rodiny cytokinových receptorů. Leptinové receptory jsou produkty tzv. diabetes genů, což jsou geny zodpovědné za onemocnění diabetem I. typu (Chen et al., 1996). Alternativním sestřihem může vzniknout nejméně 6 izoform leptinových receptorů. Leptinový receptor prostřednictvím Janus kinázy, která fosforyluje Tyr obR, umožní asociaci a následnou fosforylaci STAT (druzí posli), kteří v jádře regulují genovou expresi vybraných genů.

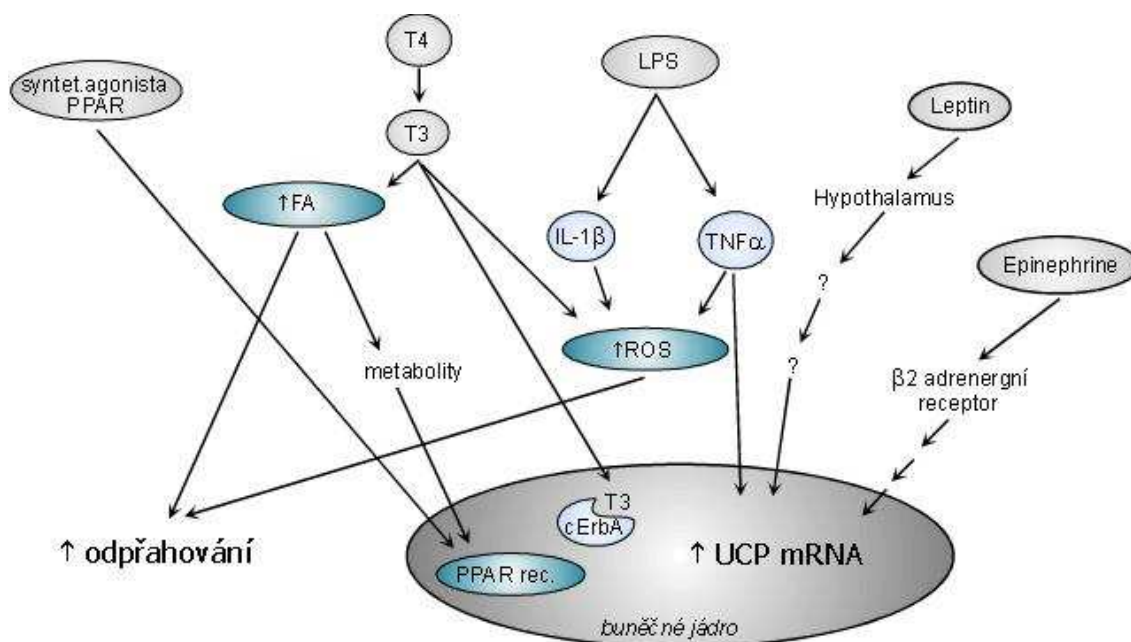
Bylo objeveno, že leptin pozitivně reguluje transkripci *ucp2* genu a zvyšuje koncentraci UCP2 mRNA v tukové tkáni až 10krát. V pankreatických ostrůvcích zvyšuje až 6krát koncentraci UCP2 mRNA a také zvyšuje množství mitochondriální a peroxizomální oxidační enzymy, zatímco snižuje mRNA esterifikačních enzymů. V hnědé tukové tkáni zvyšuje leptin hladiny mRNA UCP1 a UCP3. Další informace o regulaci UCP leptinem jsou shrnuty v review Ježek 2002 (Ježek, 2002).

Transkripce *ucp2* je regulována také thyroïdními hormony. Tyto mediátory, odvozené od aminokyseliny tyrozinu, vystupují v široké škále biologických procesů. U savců ovlivňují především ontogenetický vývoj a energetický metabolismus. Na mitochondriální úrovni stimuluje respiraci

zvýšením aktivity dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace. Thyroidní hormony T3 a T4 reagují se specifickými thyroidními receptory TR $\alpha$  a TR $\beta$ . Mezi T3 responzivní elementy patří i *ucp*, avšak přesný mechanismus regulace není doposud objasněn. Thyroidní hormony mají pravděpodobně dvě funkce, jednou je iniciace transkripce a druhou by měla být indukce odpráhovací aktivity. Tyto hormony by měly být agonisty dalších aktivátorů UCP proteinů, které by např. měly regulovat uvolňování volných MK apod. Na potkaním modelu měl T3 největší efekt na expresi *ucp2* v srdci, svalu a bílé tukové tkáni, zatímco v ledvinách a játrech byl efekt nulový (Lanni *et al.*, 1997, Lanni *et al.*, 2003).

Dalším typem regulace transkripce je vazba polynenasycených mastných kyselin a eikosanoidů na jaderné receptory. Tyto receptory jsou nazvány PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) a v buňce fungují jako transkripční faktory. PPAR hrají důležitou roli v regulaci buněčného vývoje, diferenciaci a metabolismu vyšších organismů. Dosud byly nalezeny tři typy těchto receptorů. Typ alfa exprimovaný v játrech, ledvinách, srdci, svalu a tukové tkáni; typ beta exprimovaný především v mozku, tukové tkáni a pokožce a konečně typ gamma, který má další tři podtypy  $\gamma_1$  (srdce, sval, tlusté střevo, ledviny, slinivka a slezina),  $\gamma_2$  (tuková tkáň),  $\gamma_3$  (makrofágy, tlusté střevo a bílá tuková tkáň). Všechny typy PPAR tvoří heterodimery s retinoidním X receptorem (RXR) a váží se specificky na DNA. Vazebná doména těchto jaderných receptorů typu zinkových prstů se váže na konzervovanou sekvenci AGGTCAXAGGTCA, kde X je libovolný nukleotid. Oblast promotoru *ucp* obsahuje elementy typické pro aktivní promotory genu energetického metabolismu, jako jsou S1 element, sterol responsivní element a dvojitý E-BOX motiv, který je pravděpodobně klíčový pro funkci promotoru (Medvedev *et al.*, 2001). *ucp2* gen je regulován pomocí PPAR $\alpha$  a PPAR $\gamma$  a to ve všech tkáních svého výskytu (kosterní sval, srdeční sval, bílá tuková tkáň, slezina, játra, atd.).

Transkripce druhého odpráhujícího proteinu je také ovlivňována cytokiny. Cytokiny jsou signální proteiny a glykoproteiny působící jako hormony a neurotransmitery. Cytokinová proteinová rodina je složena především z malých proteinů o velikosti 8 až 30 kDa. Cytokiny jsou nezbytné pro působení vrozené a získané imunitní odpovědi. Jsou často sekretovány buňkami imunitního systému, které se v minulosti již setkaly s patogenem. V regulaci transkripce UCP2 se uplatňují pyrogenní cytokiny, např. TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Touto cestou bakteriální lipopolysacharid (LPS, stimulátor infekce) zvyšuje hladinu UCP2 mRNA 28krát v játrech a 5krát ve svalu a tukové tkáni (Faggioni *et al.*, 1998). Tento efekt se nevyskytuje v jaterních makrofázích, ale byl prokázán v izolovaných hepatocytech (Cortez-Pinto *et al.*, 1998). Po stimulaci LPS se hladina mRNA i proteinu UCP2 snižuje u makrofágů (Kizaki *et al.*, 2002) a analogicky se zvyšuje hladina ROS. Zvýšená hladina ROS indukuje expresi NO-syntázy a následně NO, který je mediátorem mikrobicidní a tumorocidní imunitní odpovědi makrofágů.



obrázek 6: Regulace transkripce UCP2 mRNA

#### 5.4.2.2. UCP2 a fyziologie buňky

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

Hlavním mechanismem, kterým může UCP2 zasahovat do fyziologie buňky, je odpřažení oxidačních a fosforylačních procesů. Tímto způsobem odpřahující proteiny snižují membránový potenciál na vnitřní mitochondriální membráně a produkci mitochondriálního ATP, která dále ovlivňuje buňku a v případě pankreatických β-buněk i celý organismus.

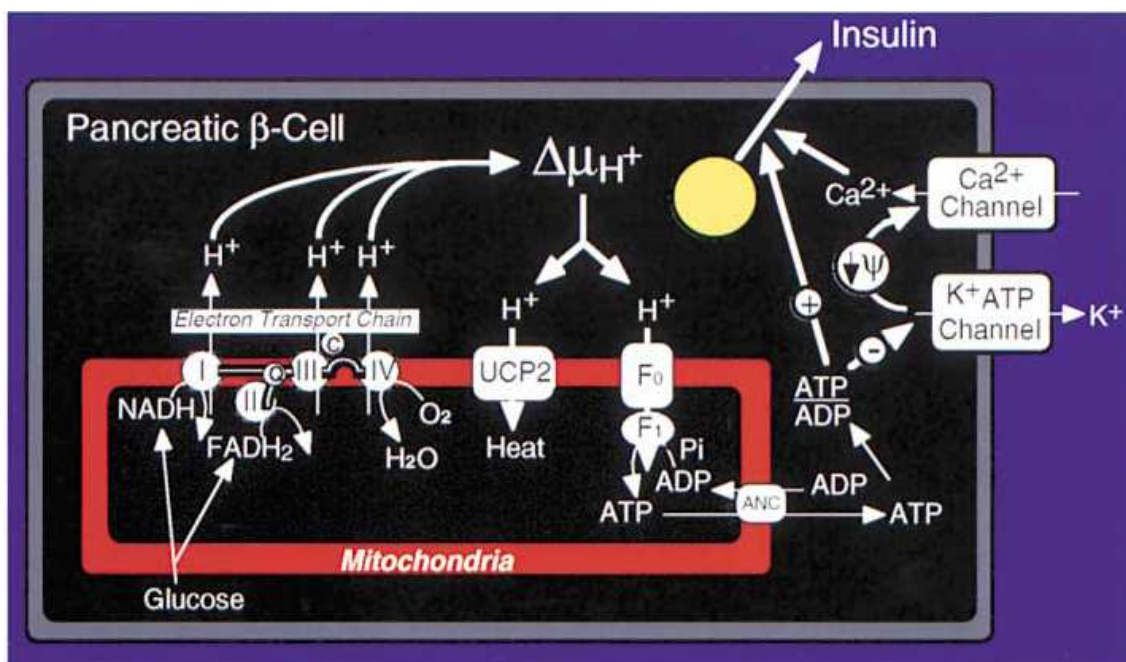
Jelikož UCP2 ovlivňuje mitochondriální membránový potenciál, mohl by touto cestou ovlivňovat dynamiku  $Ca^{2+}$  iontů a jejich tok do mitochondrie. Vápník je klíčovým prvkem buněčných signálních kaskád a podílí se i na indukcii apoptózy. Mitochondriální příjem vápenatých iontů je řízen Nernstovou rovnicí.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

Mitochondriální produkce ROS je přímo spjata s membránovým potenciálem. Hyperpolarizace (vysoké  $\Delta\psi$ ) zvyšuje a podporuje tvorbu ROS. Profesor Skulachev jako první navrhl, že by jemné odpřažení mohlo být prospěšné pro snížení tvorby radikálů (Skulachev, 1996). ROS z dýchacího řetězce způsobují peroxidaci lipidů. Hydroperoxyd mastných kyselin či polynenasycené mastné kyseliny jsou



uvolněné fosfolipázou A2 a aktivují jemné odpřažení, způsobené UCP2 (Jaburek et al., 2004, Jezek et al., 2010a). Byla vyslovena hypotéza, že produkce hydroperoxy mastných kyselin a jejich následný transport přes UCP2 vedou ke snížení membránového potenciálu a následnému snížení tvorby ROS a oxidačnímu poškození buňky (Jaburek et al., 2004). Nověji se ukazuje, že je mitochondriální fosfolipáza A2 aktivována ROS a odštěpením MK aktivuje UCP2 (Jezek et al., 2010a).

Dalším důležitým fyziologickým jevem, ve kterém vystupuje druhý odpřahující protein, je glukózou stimulovaná sekrece inzulínu (GSIS) v pankreatických  $\beta$ -buňkách. Proces začíná absorpcí glukózy v tenkém střevě. Glukózovou homeostázu udržují především pankreatické  $\beta$ -buňky sekretující inzulín v poměru k rostoucí koncentraci glukózy v krvi.  $\beta$ -buňky vnímají hladinu glukózy na základě rostoucího poměru ATP/ADP. To vede k uzavírání  $K^+$  ATP dependentních kanálů plasmatické membrány a také k depolarizaci aktivující vápníkové kanály. Tento indukovaný vtok  $Ca^{2+}$  iontů aktivuje inzulínovou sekreci. Inzulín snižuje produkci glukózy v játrech a stimuluje její příjem ve svalu a v bílé tukové tkáni. Uměle zvýšená exprese UCP2 potvrdila, že sníží-li se koncentrace ATP v  $\beta$ -buňkách, sníží se také intenzita uzavírání  $K^+$  ATP dependentních kanálů, které snižují GSIS. To je způsobeno pravděpodobně inhibicí ATP dependentního uvolňování inzulínových granulí a exocytózy (Chan et al., 2001). UCP2 by tedy v tomto procesu mohl vystupovat jako negativní regulátor výlevu inzulínu (obrázek 7).



obrázek 7: Schéma regulace GSIS pomocí UCP2 (Zhang et al., 2001)

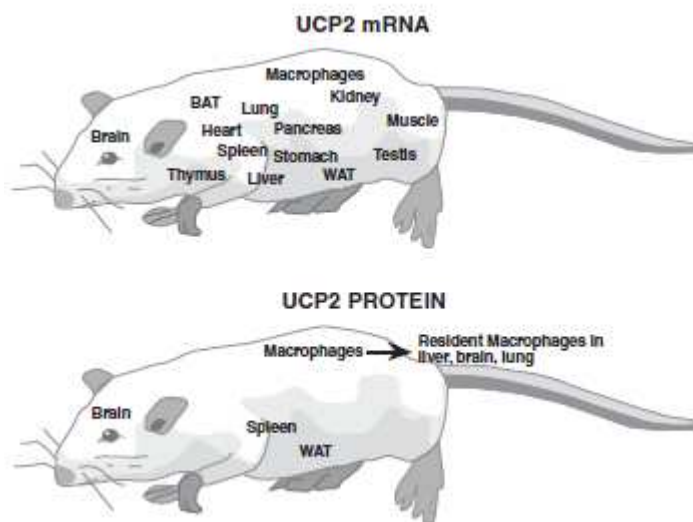
Naproti tomu při hladovění dochází k ubývání množství glukózy v krvi a hlavním zdrojem energie se stávají lipidy. Jaterní glykogen je rychle odbourán a buňky bílé tukové tkáně uvolňují mastné kyseliny, které jsou v játrech odbourávány  $\beta$ -oxidací na acetyl-CoA. Vzniklá energie a acetyl-CoA slouží pro tvorbu VLDL (very low density lipoproteins) váčků, zajišťujících přísun energie ostatním

tkáním a buňkám. V této chvíli je sekrece inzulínu v pankreatických  $\beta$ -buňkách minimalizována i díky UCP2. Volné mastné kyseliny, vyskytující se v tento okamžik v krvi, totiž působí jako transkripční i funkční aktivátory UCP2. UCP2 má navíc velice krátký poločas existence (~30 min) (Azzu a Brand, 2010). Díky těmto vlastnostem se UCP2 řadí mezi nejvýznamnější kandidáty pro rychlou regulaci biologické odpovědi na přísun živin a hladovění.

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

#### 5.4.2.3. Distribuce UCP2

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



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

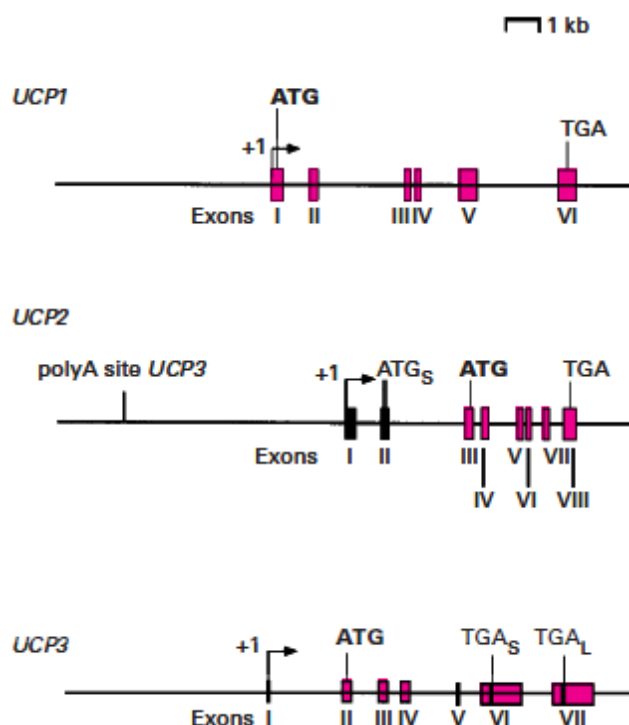
#### 5.4.3. UCP3

Třetí odpráhuující protein byl objeven v roce 1997 (Boss *et al.*, 1997), sekvenčně odpovídá charakteristikám MACP rodiny (obsahuje sekvence odpovídající transmembránovým helixům,



nukleotid-vazebnou doménu apod.). Aminokyselinová sekvenční podobnost s UCP1 je 57% a s UCP2 73%. Myší UCP3 cDNA kóduje 308 aminokyselin, jeho celková velikost je 34 kDa a s lidskou formou UCP3 sdílí 85,6% aminokyselinové sekvenční podobnosti.

UCP3 gen se u myši nalézá na chromozómu č. 7, u lidí na chromozómu č. 11 a u potkana na chromozómu č. 1. Myší gen má sedm exonů, z nichž první je nekódující. Klonování cDNA UCP3 ukázalo, že lidský gen je exprimován ve dvou alternativních sestřihových variantách, které vznikají odlišným sestřihem posledního intronu. Předpokládá se vznik dvou proteinů UCP3<sub>L</sub> dlouhého 312 aminokyselin a UCP3<sub>S</sub> s 275 aminokyselinami postrádajícího poslední doménu. Obě dvě mRNA jsou exprimovány v podobných množstvích v lidském kosterním svalu (*Ricquier a Bouillaud, 2000*).



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

Myší UCP3<sub>L</sub> cDNA má 5' nepřekládanou oblast dlouhou 197 bp, otevřený čtecí rámec dlouhý 927 bp a 3' nepřekládanou oblast velkou 1323 bp s polyadenylačním signálem AATAAA a poly A koncem. Promotor transkripce se nachází 6,7 kbp před začátkem transkripce. Pozice míst pro transkripční regulátory jsou od promotoru UCP1 odlišně rozmístěny. Předpokládá se, že ucp3 promotor nemá klasický TATA-box, ale má E-box, vazebná místa pro MEF2 (myocyte enhancer faktor 2), PPAR receptory, thyroïdní hormony a dvě místa pro vazbu MyoD (*Yoshitomi et al., 1998*).

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

#### 5.4.3.1. Funkce UCP3 a fyziologie buňky

Stejně jako u druhého odpřahujícího proteinu, není u UCP3 dodnes přesně známá jeho funkce. První hypotetická funkce vyplynula z jeho homologie k UCP1. UCP3 by tedy měl způsobovat snížení membránového potenciálu a odpřažení dýchacího řetězce od ATP-syntázy. Několik studií prokázalo, že UCP3 nezpůsobuje bazální protonové odpřažení (samovolný přechod protonů přes membránu, způsobený vysokým membránovým potenciálem), ale funguje pouze na základě intracelulární signalizace (*Bezaire et al., 2001*). Otázkou také zůstává, jakým mechanismem je odpřažení dosaženo (viz kapitola 4.4.1.3.).

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

Druhou možnou funkcí třetího odpřahujícího proteinu by mohla být ochrana před reaktivními kyslíkovými radikály, vznikajícími v elektrontransportním řetězci (viz výše). Snížení potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně, způsobené odpřažením UCP3 by tedy mohlo snižovat aktuální tvorbu ROS (*Bezaire et al., 2007*).

Při absenci aktivátorů protonového transportu, by mohly odpřahující proteiny transportovat některé jiné ionty. V případě UCP3 exprimovaného ve svalových glykolytických vláknech může být tento protein pasivním pyruvátovým transportérem a zajišťovat rovnováhu mezi glykolýzou a oxidativní fosforylací. Pyruvát by mohl být pomocí UCP3 transportován do cytosolu, kde je přeměněn na laktát. K tomuto závěru přispěl fakt, že je zde UCP3 exprimován ve vysokém počtu a že některé známky funkce UCP3 zmizely po odebrání glukózy z média (*Mozo et al., 2006; Jezek a Borecky, 1998*). Mitochondrie v glykolytických buňkách by mohly být vybaveny samoinhibujícím mechanismem, který odstraňuje mitochondriální substrát společně se zvyšováním polarizace a mohly by tak mírnit Pasteurův efekt, kterým mitochondrie inhibují glykolýzu.

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

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

#### 5.4.3.2. Distribuce UCP3

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

#### 5.4.4. UCP4

Čtecí rámec pro lidský gen *ucp4* definuje mitochondriální membránový protein o 323 aminokyselinách s předpokládanou molekulovou hmotností 36,06 kDa a pI v hodnotě 9,28. Sekvenční podobnost s *ucp1* je 29%, s UCP2 33% a s UCP3 34%. Jako jiné odpřahující proteiny má i UCP4 šest transmembránových domén, tři proteinové motivy typické pro mitochondriální přenašeče a doménu vázající nukleotidy. V potkaním mozku jsou exprimovány 3 různé izoformy, které se od sebe odlišují na karboxylovém konci. U člověka se lokus tohoto genu nachází na 4. chromozómu, u myši na 17. chromozómu a u potkana na 9. chromozómu (*Mao et al., 1999*).

##### 5.4.4.1. Regulace exprese a odpřahující aktivity

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

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

##### 5.4.4.2. Distribuce UCP4

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

#### 5.4.5. UCP5

Mezi savci je proteinem s velmi konzervovanou sekvencí. Potkaní UCP5 má vysokou homologii (přes 95%) s myšími a lidskými proteiny. Pro lidský gen byly nalezeny 3 proteinové izoformy, L pro dlouhou verzi proteinu, S pro krátký protein a SI, což je krátká verze s vloženou sekvencí. V myších tkáních byly nalezeny pouze 2 izoformy, L a S. L izoforma je tvořena 325 aminokyselinami a je nejvíce příbuzná s ostatními odpřahujícími proteiny. S UCP3 a UCP4 má 39% aminokyselinovou identitu a má

všechny domény jako zbylé odpřahující proteiny. Navíc má unikátní hydrofóbní sekvenci 22 aminokyselin, která nebyla nalezena u jiných UCP. Její funkce není známá, ale pravděpodobně bude sloužit k ukotvení v membráně. UCP5S je kratší o tři aminokyseliny (23 až 25 aminokyselina – valin, serin, glycin - jsou deletovány). UCP5SI (353 AK) má mezi třetí a čtvrtou transmembránovou doménou vložený inzert o velikosti 31 AK a navíc postrádá stejné tři AK jako jako UCP5S. Inzertovaná sekvence obsahuje hydrofóbní AK a může být zapojena v interakcích s mitochondriální membránou.

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

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

#### **5.4.5.1. Regulace exprese UCP5, fyziologická funkce**

Hladovění snižuje metabolickou rychlost a mělo by tedy snižovat i množství exprimovaných odpřahujících proteinů. Po 24 hodinách hladovění měly myši průkazně nižší hladinu UCP5 mRNA. Po podání stravy se hladina opět vrátila do normálu (*Yu et al., 2000*).

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

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

#### **5.4.5.2. Distribuce UCP5**

Lidský UCP5 se vyskytuje ve většině typů mozkových tkáních, nejméně však v míše a kalózním tělese. Relativně vysoké hladiny UCP5 mRNA byly detekovány v mozkové kůře, mozečku a v oblastech frontálního a temporálního laloku. Dále byl nalezen ve varlatech, ledvinách, děloze, srdci, plíci, žaludku, játrech a kosterním svalu. Nejvyšší exprese však dosahuje v mozku a ve varlatech. V myších tkáních byla UCP5 mRNA detekována v mozku, varlatech, bílé tukové tkáni, ledvinách, hnědé tukové tkáni, kosterním svalu, játrech a v srdci. Ve všech těchto myších tkáních byla dominantní S forma UCP5, zatímco v lidských tkáních je přednostně transkribována delší forma UCP5L. UCP5SI

byla detekována pouze v černé substanci lidského mozku a u myši nebyla nalezena v žádné tkáni (*Yu et al., 2000*).

## 6. Metodika

### 6.1. Přístroje

Box na tkáňové kultury: HERAsafe KS 12, Thermo Fisher Scientific, USA  
Box s *in vivo* prostředím: Sci-tive UM-001, Ruskinn, Velká Británie  
Inkubátory: Innova CO-170, New Brunswick Scientific, USA  
Box s laminárním prouděním vzduchu: Heraeus instruments HS12/2, Německo  
Centrifuga: Eppendorf centrifuge 5417, Německo  
Elektroforetická aparatura: Hu 13 Midi, Scie-Plas, Velká Británie  
Elektroforetický zdroj napětí: Amersham EPS301, Velká Británie  
Zařízení pro dokumentaci gelů: Gel Logic 112, Carestream Health, USA  
Gradientová PCR: Mastercycler gradient Eppendorf, Německo  
Lightcycler™ Instrument 2.0 Roche, USA  
Spektrofotometr: Nanodrop 1000, USA  
Stolní centrifuga a vortex: CombiSpin Kisker-Biotech, Německo  
UV transiluminátor: Ultra-Lum, USA  
Magnetický separátor: Roche, Německo  
Autokláv: Tuttnauer 2540 EL, Nizozemí  
Sterilizační pec: Memmert, Německo  
Vyhřívaný bloček: MB-102, Biver, Japonsko  
Počítání buněk: Countess, Invitrogen, USA

### 6.2. Materiál

#### 6.2.1. Modelové organismy, kultivace

Pro zjištění základních transkriptů UCP genů byly použiti samci laboratorní myši *Mus musculus* kmene C57Bl/6N stáří kolem dvou měsíců a laboratorní potkani *Rattus norvegicus* kmene Wistar z chovu Fyziologického ústavu stejného stáří. Při pokusech s hladovějícími myšmi byly použity samice *Mus musculus* laboratorního kmene C57BL/6J a stejný GMO mutovaný *ucp2* (-/-) kmen, opět starý cca 2 měsíce. Zvířata byla usmrcena, následně byly odebrány tkáně a uloženy v kryoskopických zkumavkách v tekutém dusíku. Všechny vzorky byly skladovány při -70°C do doby zpracování.

Použité tkáňové kultury byly potkaní inzulinomové INS-1E buňky darované prof. Pierre Maechlerem, univerzita Ženeva. Buňky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 bez glukózy s dodanou 8mM glukózou, 2mM L-glutaminem, 10mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonate

(HEPES), 1mM Na pyruvát, 5% fetal calf serum (FCS), 50 $\mu$ M mercaptoethanol, 50 U/ml penicilinu, 50 $\mu$ g/ml streptomycinu a 100 $\mu$ g/ml neomycinu.

Buňky byly vystaveny nízkému kyslíku dle protokolu, ošetřeny trypsinem pro uvolnění ze dna kultivační láhve. Vše v boxu s nízkým kyslíkem. Poté byly buňky vyjmuty z boxu stočeny 900g po dobu 3 minut a zpracovány dle RNA izolačního kitu (Qiagen).

### 6.2.2. Chemikálie

2-merkaptoetanol	Sigma
Octan sodný	Sigma
Agaróza	Top-Bio
Citronan sodný	Spolchemie
Dithiothreitol	Sigma
DNA marker	Fermentas
DNáza I, bez RNáz	Top-Bio
Elektroforetický vzokový pufr	Fermentas
Etanol (96%)	Penta
Ethidium bromid	Sigma
Fenol pH 4,3	Sigma
Kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma
Izothikyanát guanidinia (GITC)	Fluka
Chloroform	Penta
Kyselina boritá	Sigma
Dodecylsulfát sodný	Sigma
Chlorid litný (LiCl, 99%)	Sigma
N-lauroylsarkosin	Sigma
Oligo poly dT 3' - 20nt	Metabion
Streptavidinové magnetické partikule	Roche
Tris(hydroxymethyl)aminometan (Tris)	Sigma
Pwo polymeráza	Roche
dNTP 50x Mastermix	Fermentas
LightCycler RNA amplification kit hybridization probes	Roche
LightCycler kapiláry	Roche
Hybridizační primery a fluorescenční próby	TIB Molbiol
Tekutý dusík	

## 6.3. Protokoly

Všechny nástroje pro manipulaci s tkáněmi určenými pro izolaci RNA byly zabaleny v hliníkové folii a sterilizovány v sterilizační peci po dobu 6-ti hodin při 180°C. Zkumavky, špičky, centrifugační zkumavky, voda a potřebné roztoky byly sterilizovány autoklávováním (2x 25 min, 125 kPa). Potřebné manipulace s RNA a mRNA byly prováděny v laminárním boxu.

### 6.3.1. Izolace celkové RNA z tkání

Izolace celkové RNA byla provedena fenol-chloroformovou metodou (*Chomczynski a Sacchi, 1987*), jelikož ve srovnání s dostupnými komerčními kity dávala nejvyšší výtěžky RNA a z hlediska pozorovaných tkání byla nejvíce flexibilní.

Zamrazená tkáň (100-300 g) byla drcena pod tekutým dusíkem na prášek. Rozdrcená tkáň v 50 ml zkumavce byla zalita 3 ml lyzačního pufru, 300 µl octanového pufru (3 M, pH=4) a co nejlépe rozpuštěna pomocí vortexu. Dále bylo přidáno 2,5 ml kyselého fenolu (pH=4,3) a 900 µl chloroformu s následným promícháním pomocí vortexu. Vzniklý roztok byl inkubován 10 minut na ledu a poté přepipetován do 2 ml mikrozukmavek. Ty byly centrifugovány 10 minut při 10.000x g. Opatrně byla odebrána horní (vodná) fáze a přendána do nové 2 ml mikrozukmavky. Vzorek byl poté zalit dvojnásobným množstvím etanolu (96%) a RNA byla srážena na jednu hodinu (nejlépe přes noc) v mrazáku (-20°C). Následovala centrifugace při 20.000x g, 4 °C po dobu 20 minut. Usazená peleta byla dvakrát promyta v 75% etanolu a opět centrifugována při 20.000x g, 4 °C po dobu 20 minut. Vysrážená RNA se nechala vyschnout a poté byla resuspendována v 30 µl vysterilizované vody. U takto zpracované RNA byla změřena koncentrace a v případě dostatečné kvality byl vzorek buď zamrazena v hlubokomrazícím boxu (-80°C) nebo dále zpracován.

### 6.3.2. Izolace celkové RNA z buněk tkáňových kultur

Celková RNA z tkáňových kultur INS-1E byla izolována pomocí kitu na izolaci RNA firmy QIAGEN. Tento kit kombinuje technologie založené na centrifugaci a vazbě RNA k speciální silikagelové membráně. Eluční pufr o vysoké koncentraci solí umožňuje uvolnění RNA o délce větší než 200 nt a množství až 1 mg. Tímto mechanismem pak dochází k nabohacení eluované RNA o mRNA, protože cca 15 – 20% celkové RNA tvoří právě malé RNA menší než 200 nt (5,8S rRNA, 5S rRNA a tRNA).

INS-1E buňky jsou v porovnání s jinými běžně používanými tkáňovými kulturami (HeLa, HepG2) zdají být mnohem menší. Proto jsme používali pro izolace větší množství buněk, než kolik bylo uvedeno v manuálu (cca 1,5 – 2krát). Střední kultivační láhev buněk byla dvakrát omyta PBS, ošetřena trypsinem a 10 µl roztoku trypsinu s buňkami bylo použito pro určení množství buněk. Zbylé buňky byly centrifugovány a jejich pelet byl rozpuštěn v 4 ml RLT pufru (v případě, že počet buněk byl vyšší než  $5 \times 10^7$ , jinak byly použity 2 ml). Následně byly buňky homogenizovány pasírováním 5-10krát přes



0,9 mm jehlu s 5 ml injekční stříkačkou. Do buněčného lyzátu byly přidány 4 ml 70% etanolu, aby se RNA lépe zachytávala na silikagelové membráně. Vzorek byl nanesen na silikagelovou membránu v 15 ml zkumavce a centrifugován pět minut při 5.000x g. Vše, co prošlo přes membránu bylo odstraněno. Následovalo promytí pufrům RW1 a centrifugace pět minut při 5.000x g a pak dvakrát pufrům RPE s centrifugace pět minut při 5.000x g, opět bylo vše, co proteklo přes membránu odstraněno. Eluce byla provedena do nové 15 ml falkony do 200  $\mu$ l vody bez RNáz. Po nanesení vody na membránu stál vzorek po dobu tří minut při pokojové teplotě, aby se mohla veškerá RNA uvolnit do vody. Ta byla poté centrifugována tři minuty při 5.000x g. Poslední krok byl opakován ještě jednou pro zvýšení celkového výtěžku.

### 6.3.3. Počítání buněk

Odhad počtu buněk, důležitý pro určení množství lyzačního pufru při izolaci celkové RNA, byl proveden pomocí přístroje Countess od firmy Invitrogen. Countess automated cell counter má pracovní optimum mezi koncentracemi  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^7$  buněk/ml.

Z kultivační lahve bylo odsáto medium, buňky byly dvakrát promyty v PBS a trypsinizovány po dobu 3 min při 37°C. Buňky s roztokem trypsinu byly přepipetovány do 15 ml falkony, z které bylo odebráno 10  $\mu$ l roztoku pro stanovení množství buněk a zbylá část roztoku byla stočena a usazené buňky byly dále zpracovány.

K odebraným 10  $\mu$ l buněčné suspenze bylo přidáno 10  $\mu$ l 0,4% trypanové modři. Roztok byl pečlivě smíchán a 10  $\mu$ l směsi bylo nanesen na sklíčko počítací komůrky. To bylo vloženo do přístroje Countess, který buňky spočítal. Podle množství buněk bylo použito odpovídající množství lyzačního roztoku při izolaci celkové RNA.

### 6.3.4. Izolace mRNA z celkové RNA

Aby bylo dosaženo vyšší kvality a kvantity mRNA byla mediátorová RNA izolována z již připravených izolátů celkové RNA a to pomocí *mRNA isolation kit* firmy Roche. Tento kit využívá 3' polyadenylovaného konce mRNA, který zachytává pomocí thymidinového polynukleotidu s avidinem, přes nějž se váže na streptavidin s magnetickou partikulí. Magnetické partikule s navázanou mRNA jsou drženy na stěně mikrozukavky, která je usazena ve stojánku s magnetickou ploškou. Díky tomuto mechanismu můžeme následně odmýt ostatní skupiny nukleových kyselin, jenž nás nezajímají. Poměr mezi množstvím celkové RNA a takto vyizolované mRNA byl většinou 15:1.

Do mikrozukavky s celkovou RNA bylo přidáno 200  $\mu$ l lyzačního pufru tak, aby množství lyzačního pufru bylo větší než 1/2 výsledného objemu. Lyzáat byl zahříván v termobloku na 65°C po dobu dvou minut. Mezitím byly promyty streptavidinové magnetické kuličky lyzačním pufrům. Do vytemperovaného lyzátu bylo přidáno 1,5  $\mu$ l thymidinových polynukleotidů a vzniklý roztok byl přepipetován k promytým magnetickým kuličkám. Kuličky s lyzátem byly lehce zvortexovány a inkubovány v termobloku pět minut při 37°C, aby došlo k správnému spojení jednotlivých komponent.

Následně byla mikrozkumavka s RNA umístěna do magnetického stojánku a kuličky s navázanou mRNA byly třikrát promyty promývacím pufrem. Po promytí bylo ke kuličkám přidáno 20  $\mu$ l čisté vody a mikrozkumavka byla temperována dvě minuty na 65°C pro uvolnění mRNA z komplexu s kuličkami. 20  $\mu$ l vzorku s mRNA bylo opatrně přepipetováno do nové mikrozkumavky a byla změřena koncentrace vyizolované mRNA. V případě dostatečné kvality byla tato mRNA buď zamražena při -80°C nebo dále zpracována.

## 6.4. Gradientová PCR

Gradientová PCR je varianta polymerázové řetězové reakce (PCR), která nám spolu s agarózovou elektroforézou dává užitečnou pomůcku pro upravení podmínek qPCR. Po nasyntetizování navržených primerů bylo nutno optimalizovat jejich teplotu nasedání. Optimalizací nasedací teploty primerů můžeme ovlivňovat výtěžnost PCR a tvorbu nespecifických PCR produktů. Tato optimalizace byla provedena na přístroji Mastercycler gradient firmy Eppendorf, který umožňuje změnu teploty na cca 10-ti pozicích v rozmezích dvou až dvaceti stupňů celsia.

Pro naše testovací podmínky byl vytvořen univerzální protokol uvedený v tabulce č.2. s gradientem uvedeným v tabulce č.3. Komponenty PCR byly namíchány jako v případě normální qPCR.

tabulka 2: Průběh PCR programu při gradientové PCR:

		Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace		94	120	1
Amplifikace	denaturace	94	30	
	nasedání	*	30	40
	polymerace	72	45	
Chlazení		40	30	1

tabulka 3: Teplotní gradient v jednotlivých jamkách

Jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Teplota (°C)	50,0	51,0	52,0	53,0	54,0	55,0	56,0	57,0	58,0	59,0	60,0

Výsledný produkt byl ověřen na agarózové elektroforéze podle čistoty proužku a specifity nasedání primerového páru. Vybrané nasedací podmínky jednotlivých primerů jsou uvedeny v tabulce č.10.

## 6.5. Agarózová elektroforéza

K ověřování PCR produktů z qPCR nebo gradientové PCR bylo použito horizontální elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu s TBE pufrem.

Navážené množství agarózy bylo rozmícháno v 40 ml 1x TBE pufru a rozpuštěno uvedením do varu pomocí mikrovlnné trouby. Roztok byl ochlazen na cca 60°C. Poté byly do roztoku přidány dva

mikrolitry ethidiumbromidu do výsledné koncentrace 0,5 ng/ml. Roztok byl přelit do elektroforetické vany s hřebenem, kde byl ponechán dokud neztuhnul. Takto připravený gel byl přenesen do elektroforetické aparatury s pufrem. Mezitím byly připraveny vzorky smícháním 2  $\mu$ l PCR produktu (1-1,5 mg DNA), 2  $\mu$ l vzorkového pufru a 8  $\mu$ l TBE pufru. Vzorky společně s DNA markerem byly nanесeny do jamek a byl spuštěn elektroforetický zdroj. Pro rozdělení fragmentů byla použita intenzita elektrického pole 6 V/cm po dobu 90 min. Gel byl prohlížen na UV transiluminátoru, případně zachycen a uložen digitální kamerou. Složení 10x TBE pufru (1 l):

108 g Tris HCl

55 g kyselina boritá

40 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8

## 6.6. Kvantitativní Real time PCR (qPCR)

Real time PCR nám dovoluje sledovat přibývání produktu za pomoci fluorescence v průběhu času (real time). Můžeme tak sledovat počet molekul DNA nebo cDNA v jednotlivých cyklech PCR a zpětně také počáteční počet molekul dané NK v reakci, potažmo v měřeném vzorku.

Kvantitativní Real-time PCR lze využít k detekci mutací, genetických chorob, identifikaci onkogenů, detekci patogenních mikroorganismů, zjištění počtu buněk nebo množství mtDNA, typizaci nádorů, stanovení pohlaví a ve spojení s reverzní transkripcí ji můžeme použít k měření genové exprese (na úrovni transkripce) nebo pro měření mRNA interference.

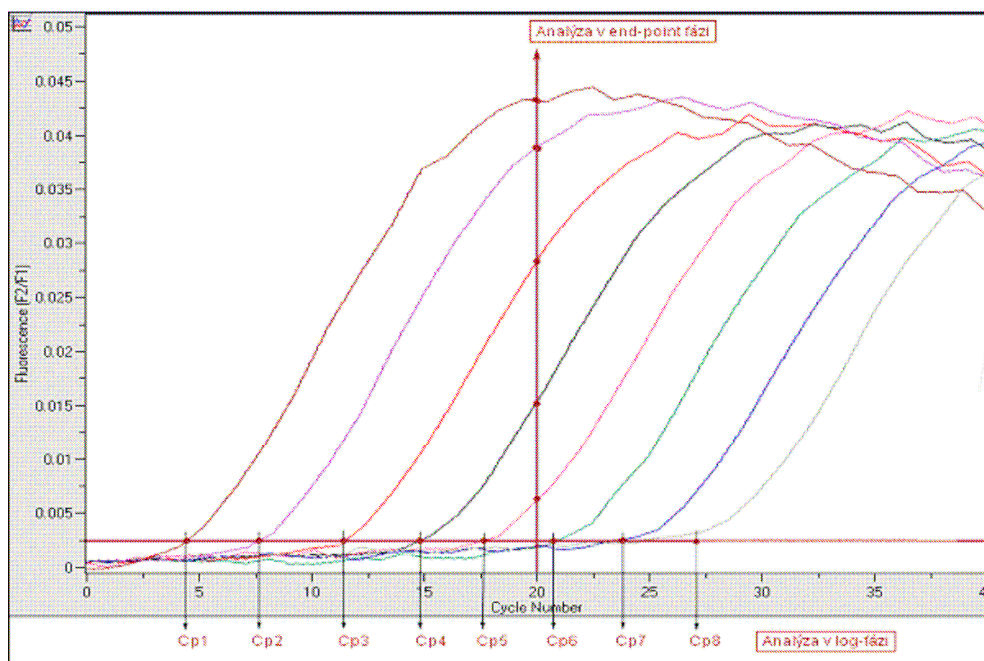
### 6.6.1. Princip Real time PCR

Každá kvantitativní PCR reakce musí obsahovat fluorescenční reportérovou molekulu, která monitoruje aktuální množství PCR produktu. S přibývajícím množstvím nově nasyntetizované DNA přibývá i množství (intenzita) fluorescence emitované z fluoroforu. PCR produkt roste sice exponenciálně, ale amplifikační křivka závislosti intenzity fluorescence na počtu cyklů má sigmoidní tvar (Viz obrázek 8.). Je to způsobeno tím, že v počátečních fázích reakce intenzita fluorescence PCR produktu ještě není silnější než fluorescence reakční směsi. Prostřední část grafu je již exponenciální a v posledních cyklech reakce, kdy dochází k postupnému vyčerpání reakčního substrátu a PCR produkt se dále nezduvojuje dochází k zaoblování křivky až do tvaru písmene „S“.

Bod v kterém se začne intenzita fluorescence rapidně zvyšovat se nazývá Ct (threshold cycle, crossing point, bod zlomu). Zpětně, za pomoci externího standardu (viz dále) lze vypočítat množství DNA nebo cDNA, které bylo v reakci na počátku. Vzorky, které mají nejvyšší počáteční koncentraci sledované DNA budou mít v každém cyklu PCR největší množství kopií, což znamená, že křivka jejich fluorescence dříve překročí zmiňovaný threshold a bude mít nižší hodnotu Ct.

Tím, že dochází k určování koncentrace v kinetické fázi reakce (exponenciální část) dostáváme přesnější informace o množství DNA v reakci, než při starší tzv. endpoint analýze. Při pohledu na

obrázek 8 můžeme vidět sbíhání sigmoidních křivek fluorescence finálních fází qPCR, v kterém dochází k detekci endpoint analýzou. Proto může při měření koncentrace endpoint analýzou docházet k výrazným nepřesnostem.



obrázek 8: Srovnání end-point analýzy a analýzy v log-fázi

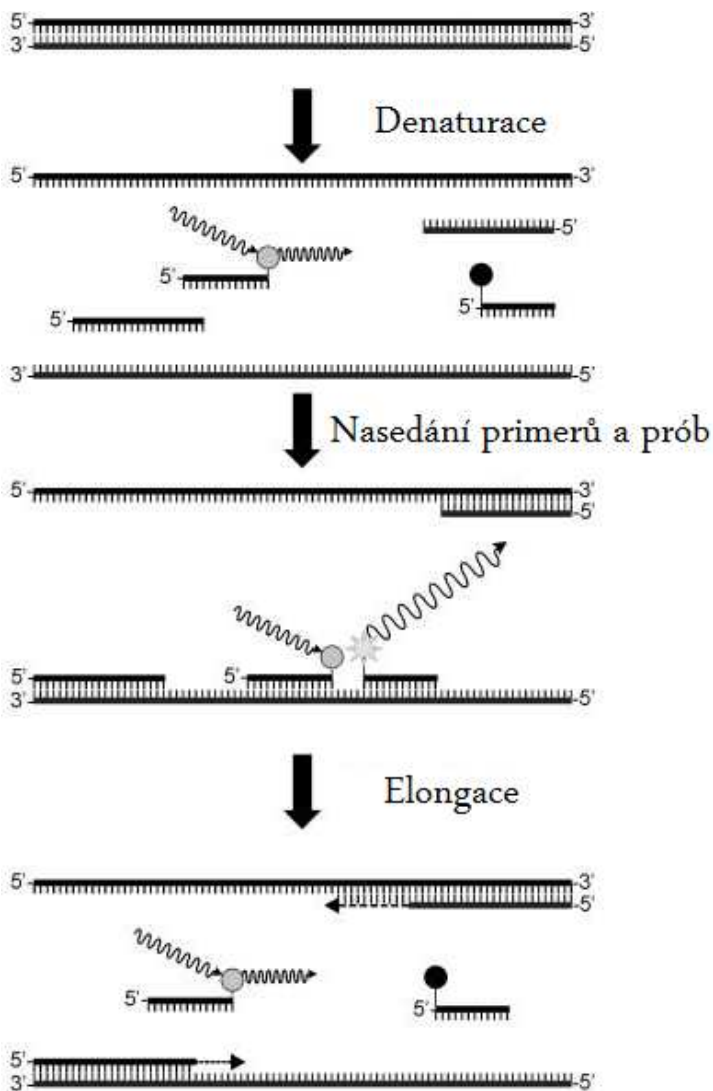
## 6.6.2. Typy sond pro detekci PCR produktu

Během vývoje real-time PCR došlo i k vývoji detekčních molekul. V dnešní době jich existuje několik druhů, univerzálních nebo specifických pro daný přístroj. Tyto detekční molekuly můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupinu tvoří tzv. nespecifické interkalační sloučeniny vázající se do malého žlábků DNA dvoušroubovice. Sem patří nejrozšířenější interkalační barviva jako SYBR Green a ethidium bromid a dále *LC Green*, *Eva Green*, *Bebo* atd. Druhou skupinu detekčních molekul tvoří specifické oligonukleotidy s různými fluorescenčními značkami. Tyto oligonukleotidy hybridizují s vybraným řetězcem amplikované DNA a svítí pouze v případě jsou-li hybridizovány s amplikonem. K této skupině patří hydrolyzační sondy (TaqMan), hybridizační FRET sondy, molecular beacons a další. Dále se budu zabývat jen hybridizačními sondami FRET a interkalačním barvivem SYBR Green, které byly použity v této diplomové práci.

RT-PCR založená na detekci amplikonu pomocí SYBR Green má téměř stejné složení jako normální PCR. RT-PCR má ještě navíc právě interkalační barvu SYBR GREEN. Většina komerčních kitů se prodává ve formě master mixu nukleotidů, SYBR Greenu, solí a polymerázy, který je již nakalibrován a připraven k použití. Stačí jen přidat primery, templát a určit optimální nasedací teplotu primerů. Nenavázaná SYBR Green poskytuje v roztoku pouze nízkou fluorescenci, ale její schopnost emitovat světlo se několikanásobně zvětšuje během elongace amplikonu. Během každého cyklu je tedy

nejvyšší fluorescence na konci polymerační fáze. V denaturační fázi, kdy se rozcházejí řetězce DNA dochází k uvolnění SYBR Greenu z DNA a k poklesu fluorescence.

Dalším způsobem detekce používaným naším oddělením jsou hybridizační próby. Jejich hlavní výhodou je vysoká specifita zajišťovaná nejen primery, ale navíc i pomocí dvou hybridizačních prób. Ty jsou navrženy do oblasti ampliconu v minimální vzdálenosti 15 – 20 nukleotidů od primerů. První próba (kotevní) na svém 3' konci nese fluorescein a druhá próba (detekční) je označena jednou ze tří fluorescenčních barev LC – 530, LC – 640 a LC – 705 vhodných pro detekci na přístroji Lightcycler 2.0. Aby docházelo k přenosu fluorescenční rezonanční energie (FRET) musí být mezi próbami prostor o délce 1 – 5 nukleotidů a reakční směs musí obsahovat správnou koncentraci hořčíku (viz dále). Schématický princip PCR s hybridizačními próbami je uveden na obrázku 9. Fluorescein je excitován fotony o vlnové délce kolem 470nm a emituje fotony v zelené části spektra, které slouží jako donor pro přenos energie na LC fluorofor (akceptor). Ty poté emitují světlo sbírané třemi kanály, podle druhu fluoroforu. Hybridizační próby jsou natolik specifické, že se používají i pro rozlišení více izoform stejného genu.



obrázek 9: Detekce signálu systémem hybridizačních prób (Převzato z Bustin, 2000)

### 6.6.3. Navržení primerů, prób a amplikonu

Správné navržení amplikonu, primerů a prób je základním kamenem úspěchu při real time PCR. Optimální délka amplikonu pro real time PCR je 80 až 400 *nt*, nejmenší však 63 *bp* (Bustin, 2000). Avšak platí, že čím je amplikon kratší, tím je PCR reakce efektivnější a méně senzitivní ke změnám reakčních podmínek. Jestliže je polymerační rychlost nejpoužívanější Taq polymerázy 30 – 70 bází za sekundu, pak by měl být nastavený polymerační čas být kolem 15 *s*. S vlastnostmi amplikonu úzce souvisí i místa výběru nasedacích míst primerů.

Správně navržené primery vymezují amplikon, který obsahuje rozhraní alespoň dvou exonů, tak aby vyštěpená intronová sekvence byla co největší. V případě, že intron/exonová rozhraní jsou neznámá je třeba ošetřit vyizolovanou RNA pomocí DNázy zbavené RNáz. Optimální délka primerů je mezi 15 a 20 bázemi, množství GC bází se má pohybovat mezi 20 až 70% a jejich teplota tání ( $T_m$ ) by se neměla lišit o více než 1-2 $^{\circ}C$  s optimem okolo 58 $^{\circ}C$ .

Próby jsou navrhovány v délce okolo 20-ti až 30-ti bází a jejich  $T_m$  musí být o 5-10 $^{\circ}C$  vyšší než  $T_m$  primerů, protože amplifikace primerů nastává okamžitě po nasednutí na templát. Tím by docházelo k předčasnému odstranění próby před její detekcí. Próby tedy musejí nasedat dříve než primery. Průměrný obsah GC bází u prób by měl být kolem 50%. Navržené próby musí mít mezi sebou mezeru 1-5 nukleotidů a neměly by se překrývat s primery.

Námi navržené primery a próby byly navrženy pomocí programu Generunner a kontrolovány a syntetizovány firmou TIB Molbiol v Berlíně. Navržené oligonukleotidy byly také testovány na specifitu a tvorbu dimérů. Jsou navrženy tak, aby rozlišovaly mezi jednotlivými izoformami, aby byly situovány s přihlédnutím k způsobu izolace přes 3' polyA konce mRNA co nejbližší k tomuto konci a také aby se nacházely v translatované části genu.

### 6.6.4. Lightcycler Instrument 1.5

Tento přístroj prodávaný firmou Roche kombinuje optiku vyvinutou v průtokové cytometrii s rychlým střídáním teplot v průběhu PCR reakce. Díky těmto vlastnostem můžeme sledovat změny ve fluorescenci a tak i v amplifikaci. K přístroji je nutné mít počítač, v kterém je fluorescence kontinuálně zaznamenávána. Srdcem přístroje je termální komora, ve které je uložen karusel s maximální kapacitou 32 vzorků. Nad tímto prostorem se nachází výhřevná spirála se zásobníkem vzduchu pro rychlou změnu teploty. Rychlost teplotních změn je nastavitelná v rozmezí 0,1 – 20 $^{\circ}C \times sec^{-1}$ . Ve spodní části komory také nalezneme modrou LED diodu s detekčními filtry. Vzorky se pipetují do kapilár z bór-silikátového skla s vysokou vodivostí tepla. Šířka jedné kapiláry je 1,55 *mm* její objem je 10 – 20  $\mu l$ .

Lightcycler software umožňuje dva druhy analýzy vzorků. Prvním je metoda tzv. crossing pointů, což jsou maxima druhé derivace změny intezity fluorescence a odpovídají cyklu, v kterém fluorescenční křivka překoná bazální signál okolí. Druhou metodou je tzv. fit point analýza, při níž se manuálně nastavuje intezita fluorescence pozadí reakce tzv. threshold.

### 6.6.5. Absolutní kvantifikace s externím standardem

Kvantifikace mRNA metodou absolutní kvantifikace s externím standardem nám umožňuje stanovit přesný počet molekul DNA v reakci. Externím standardem se rozumí vzorek sledovaného genu o známé koncentraci. Z tohoto vzorku se vytvoří série ředění určená pro amplifikaci a poté k vytvoření kalibrační křivky. Nejčastěji jsem používal ředění od 100 pg do 10 fg. Absolutní kvantifikací můžeme dostat počáteční počet molekul nebo poměr transkripce našeho genu k celkové RNA nebo k transkribovaným mRNA.

### 6.6.6. Provedení qPCR

Po izolaci RNA byla u každého vzorku změřena koncentrace a ty, které dosáhly dostatečné čistoty (OD 260/280 nm vyšší než 1,8) byly naředěny na koncentraci 10 ng/μl. Poté byla naředěná RNA (mRNA) připipetována k reakční směsi.

Příklad připravení jedné reakční směsi s hybridizačními próbami o výsledném objemu 10μl:

- LightCycler RT-PCR Reaction Mix
  - Hybridization Probes 5x 2 μl
- LightCycler RT-PCR Enzyme Mix 0,2 μl
- MgCl<sub>2</sub> zásobní roztok 25 mM 0,4 μl
- H<sub>2</sub>O sterilní, PCR testovaná 3 μl
- Primery (10 μM) 2x 0,5 μl
- Hybridizační próby (3 μM) 2x 0,7 μl
- mRNA (10 ng) 2 μl

Reakční mix obsahuje směs dNTP (dTTP je nahrazen dUTP), 15 mM MgCl<sub>2</sub> a reakční pufr.

Uvedené množství MgCl<sub>2</sub> je pouze ilustrační. Správné hodnoty jsou uvedeny v části 7.1. Optimalizace kvantifikativní PCR. Enzymový mix obsahuje směs enzymů pro RT – PCR, reverzní transkriptázu a DNA polymerázu. Díky tomu je použitý kit určen pro jednostupňovou RT – PCR. Amplifikační protokol je v tabulce 4.

tabulka 4: Amplifikační protokol pro RT-PCR pro použití specifických prób

		Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Reverzní transkripce		55	1800	1
Počáteční denaturace		94	240	1
Amplifikace	denaturace	94	2	
	nasedání	*	20	40
	polymerace	72	20	
Chlazení		40	30	1

\* teplota se lišila podle amplifikovaného genu

Kvantifikace metodou SYBRGreen byla provedena dvěma kroky. Prvním byla reverzní transkripce s enzymem M-MuLV reverzní transkriptázy (RNA a DNA dependentní DNA polymeráza), která má aktivitu ribonukleázy H (specificky štěpí RNA z RNA-DNA hybridů).

Příklad připravení jedné reakční směsi na reverzní transkripci s enzymem M-MuLV:

- Templátová RNA (100 ng)
- Specifické primery (celková koncentrace 20 pmol)
- H<sub>2</sub>O sterilní, PCR testovaná (společně s primery a RNA do celkového objemu) 5  $\mu$ l
- 5x reakční pufr 2  $\mu$ l
- dNTP mix, každý nukleotid 10 mM 1  $\mu$ l
- M-MuLV reverzní transkriptáza 2  $\mu$ l

Celkový objem reakce tvořil 10  $\mu$ l. Transkripční protokol je uveden v tabulce 5.

tabulka 5: Transkripční protokol pro M-MuLV reverzní transkriptázu.

	Teplota (°C)	Čas (min)
Reverzní transkripce	37	60
Terminace reakce	70	10

Příklad připravení jedné reakční směsi se SYBRGreen o výsledném objemu 10  $\mu$ l:

- Maxima SYBRGreen/ROX qPCR Master Mix 5  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O sterilní, PCR testovaná 3  $\mu$ l
- Primery (10  $\mu$ M) 2x 0,5  $\mu$ l
- cDNA (10 ng) 1  $\mu$ l

Reakční mix obsahuje Hot start Taq DNA polymerázu, pufr složený z KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a MgCl<sub>2</sub> optimalizovaný na výslednou koncentraci 2,5 mM. Dále pufr obsahuje fluorescenční interkalační barvivo SYBRGreen I, pasivní referenční barvivo ROX a směs nukleotidů, kde je dTTP nahrazeno dUTP. Pasivní referenční barvivo ROX je u některých přístrojů (Applied Biosystems) používáno jako interní reference pro normalizaci signálu ze SYBRGreen a nemá žádný vliv na fluorescenci SYBRGreenu ani na průběh qPCR. SYBRGreen qPCR reakční mix neobsahuje žádný enzym pro přepis RNA do DNA a proto musel být před kvantifikací přidán krok reverzní transkripce (viz dále) a vytvořen nový program pro LightCycler. Navíc by měl program obsahovat denaturační analýzu pro kontrolu nasedání primerů a kontrolu amplifikovaných produktů. Nastavený program je uveden v tabulce 6.



tabulka 6: Amplifikační protokol pro RT-PCR se SYBRGREEN

		Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace		94	600	1
Amplifikace	denaturace	94	5	
	nasedání	*	15	50
	polymerace	72	15	
Melting point analýza	denaturace	94	0	1
	nasedání	50	30 - 60	44
	tání	94	0	1
Chlazení		40	30	1

\* teplota se lišila podle amplifikovaného genu

Před každou sérií měření (SYBRGreen nebo hybridizačních prób) byl namíchán master mix s jednou reakcí navíc, jako ochrana před nedostatkem master mixu při chybě v pipetování. Namíchaný vzorek přepipetován do kapilár z borosilikátového skla a následně přidána mRNA nebo cDNA. Nakonec byly kapiláry stočeny na centrifuze (2.000x g, 10 s) a uloženy do předem vychlazené olověné kazety, kde byly chráněny před světlem a teplem do doby spuštění reakce na přístroji LightCycler instrument 1.5 (Roche).

### 6.6.7. Charakterizace ampliconů

Amplicony byly navrženy podle pravidel, která jsou popsána v kapitole 6.6.3 Navržení primerů, prób a ampliconu. V tabulkách číslo 7 a 8 jsou uvedeny sekvence primerů a hybridizačních prób, délky jednotlivých ampliconů a intronů, které jsou v mRNA vynechány. V tabulce 9 jsou uvedeny sekvence primerů a amplicony navržené pro kvantifikaci UCP2 exprese v INS-1E tkáňové linii pomocí barvy SYBRGREEN.

tabulka 7: Charakteristiky ampliconů použitých při kvantifikaci UCP proteinů ve vybraných tkáních potkana (*Rattus norvegicus*)

Potkan				
gen	název oligonukleotidu	sekvence	číslo exonu + délka intronu	délka ampliconu
UCP2	přímý primer	GAGAGTCAAGGGCTAGCGC	exon 2	350bp
	fluoresceinová próba	TCAGAGCATGCAGGCATTGG-FL	exon 2	
	LC próba	LC Red640-CCGCCTCTGGCAGGTAGCp	exon 2/3, intron 1200bp	
	reverzní primer	GCTTCGACAGTGCTCTGGTA	exon 3	
UCP3	přímý primer	GTTGGACTTCAGCCATCAGAA	exon 2	418bp
	fluoresceinová próba	GAACGGACCACTCCAGCGTC-FL	exon 2/3, intron 1986bp	
	LC próba	LC Red640-CCATCAGGATTCTGGCAGGCTp	exon 3	
	reverzní primer	GTGGGTTGAGCACAGGTC	exon 3	
UCP4	přímý primer	TGGCCGAGCTAGCAACC	exon 1/2, intron 3023bp	289bp
	fluoresceinová próba	CCATTTACAGACACGTAGTGTACTCTGGA-FL	exon 2/3, intron 2421bp	
	LC próba	LC Rec 640-GTCGGATGGTCACCTACGAACAp	exon 3	
	reverzní primer	CAGAGGGGATAATGTTTCATCTCA	exon 3	
UCP5	přímý primer	GATTGTAAGCGGACATCAG	exon 1/2, intron 4713bp	419bp
	fluoresceinová próba	CGCCATACACAAAAGGTTTCCA-FL	exon 2	
	LC próba	LC Red640-TTCAGACAGACATCTCATGGCTTAAp	exon 2	
	reverzní primer	GGTTGGCAATAGTAGATGAAATC	exon 5, introny celkem 6645	
GAPDH	přímý primer	AACTCCCTCAAGATTGTCAAGAA	exon 6	316bp
	fluoresceinová próba	CAGTCTTCTGAGTGGCAGTGATGGCA-FL	exon 6/7, intron 112bp	
	LC próba	LC Red705-ACTGTGGTCATGAGCCCTTCCACGp	exon 7	
	reverzní primer	ATGTCAGATCCACAACGGATACA	exon 7	

tabulka 8: Charakteristiky amplikonů použitých při kvantifikaci UCP proteinů ve vybraných tkáních myši (*Mus musculus*)

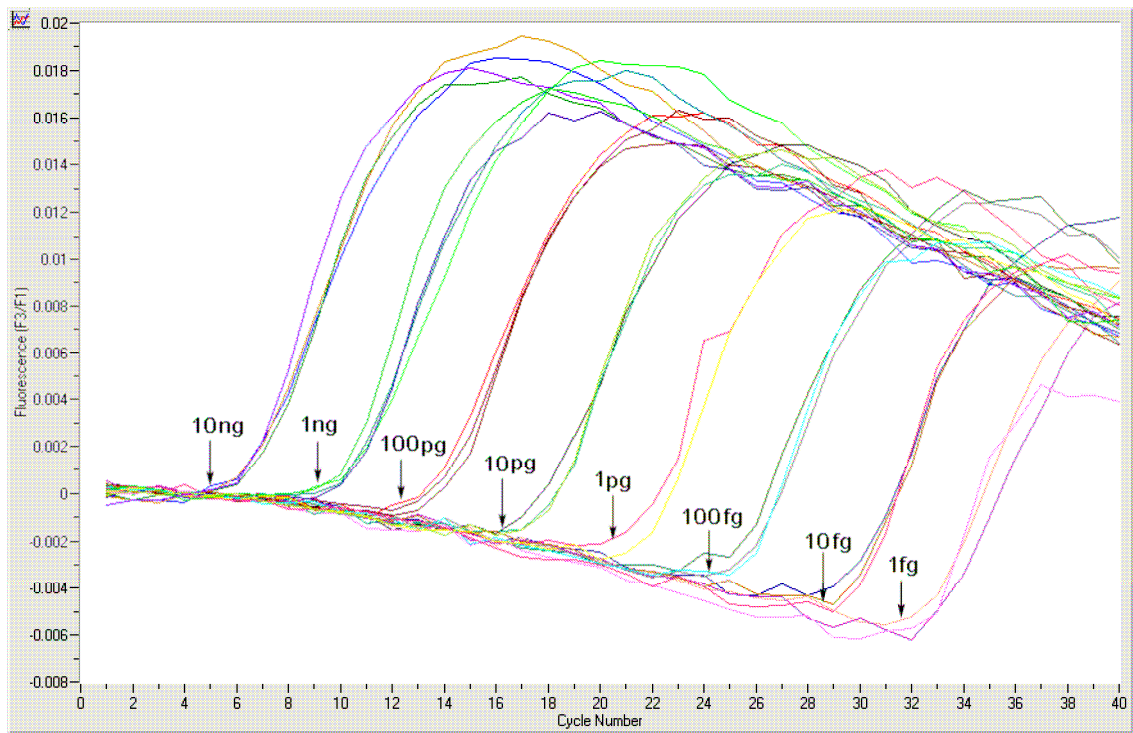
Myš				
gen	název oligonukleotidu	sekvence	číslo exonu + délka intronu	délka amplikonu
UCP2	přímý primer	GAGAGTCAAGGGCTAGTGC	exon 2	349bp
	fluoresceinová próba	TCAGAGCATGCAGGCATCGG~FL	exon 2/3, intron 772bp	
	LC próba	LC Red640-CCGCCTCTGGCAGGTAGCp	exon 3	
	reverzní primer	GCTTCGACAGTGCTCTGGTA	exon 3	
UCP3	přímý primer	GTTTACTGACAACTTCCCCT	exon3/4, intron 62 bp	165bp
	fluoresceinová próba	AAGACCCGATACATGAACGC~FL	exon 4	
	LC próba	LC Red640-CCCCTAGGCAGGTACCGCp	exon 4	
	reverzní primer	CTCCTGAGCCACCATCT	exon 4	
UCP4	přímý primer	GGACGAGCAAGTTCCTACTG	exon 1, celkem introny 8818	346bp
	fluoresceinová próba	CCATTACAGACACGTAGTGTACTCTGGA~FL	exon 4	
	LC próba	LC Red640-GTCGGATGGTCACCTATGAACATCTACp	exon 4	
	reverzní primer	CCCTCCAATGACCGATTTC	exon 4	
UCP5	přímý primer	CAGTGATTTCATCAGAAAAGTTCCA	exon 1, intron 5054 bp	133bp
	fluoresceinová próba	CGCCATACACAAAAGTTTCCA~FL	exon 2	
	LC próba	LC Red640-TTCAGACCAGACATCTCATGGCTTAAp	exon 2	
	reverzní primer	CCGTGTTTTAGTAAGATCCACAG	exon 3, intron 1543 bp	
GAPDH	přímý primer	AATGGTGAAGGTCGGTGTGA	exon 4, intron 1150 bp	229bp
	fluoresceinová próba	GGCAAATTCACGGCACAGTCAAG~FL	exon 5	
	LC próba	LC Red705-CCGAGAATGGGAAGCTTGTCATCAACp	exon 5	
	reverzní primer	CTGGAAGATGGTGATGGGC	exon 5	

tabulka 9: Charakteristiky amplikonů použitých při kvantifikaci UCP2 v buňkách INS-1E

gen	název oligonukleotidu	sekvence	číslo exonu + délka intronu	délka amplikonu
UCP2	přímý primer	CGGGCTGGCGGTGGTTCGGAGAT	exon 5, intron 75 bp	183
	reverzní primer	GAGGTTGGCTTTCAGGAGAGTAT	exon 6	
GAPDH	přímý primer	AACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA	exon 6, intron 112 bp	316
	reverzní primer	ATGTCAGATCCACAACGGATACA	exon 7	

### 6.6.8. Konstrukce kalibračních přímek

Vzhledem k vybraným metodám kvantifikace, je nutné před vlastním měřením „nakalibrovat“ amplifikaci vzhledem k narůstající fluorescenci. Kalibrační přímky byly zhotoveny pro všechny sledované geny bez rozdílu použité kvantifikační metody. Templátem byla DNA z dříve provedené testovací qPCR. U ní byla stanovena koncentrace a vytvořena ředící řada od 10 ng do 1 fg. Tato ředící řada byla poté použita pro qPCR, z které byl vyřazen krok reverzní transkripce. Ostatní parametry qPCR byly ponechány jako u běžné reakce. Výsledná kalibrace nás informuje o amplifikační účinnosti pro jednotlivé geny a dává nám možnost přiřadit hodnoty tzv. crossing pointů ke koncentracím templátu před startem amplifikace. Grafický výstup z takovéto kalibrace je uveden na obrázku 10.



obrázek 10: Kalibrace myšního genu *GAPDH*

### 6.6.9. Normalizace

V průběhu reverzní transkripce a real time PCR může dojít k některým chybám. Většinu těchto chyb, jako jsou například chybné ředění vzorku nebo částečně zdegradovaná RNA lze odstranit pomocí tzv. normalizace. Normalizace znamená, že všechny vzorky musí paralelně s kvantifikovaným genem o neznámém množství obsahovat i další gen, jehož množství v dané tkáni máme již oměřeno. Individuální odchylky v crossing pointech měřeného genu jsou poté korigovány podle již známého genu. Mezi tyto geny patří i tzv. house keeping geny, tedy geny důležité pro chod všech buněk bez rozdílu. Další nutnou podmínkou je, že se exprese vybraného house keeping genu nesmí měnit v průběhu navrhnutého pokusu. Nejběžnějšími interními standarty pro RT-PCR jsou mRNA  $\beta$ -aktinu, *GAPDH*, histon H3 nebo ribozomální RNA podjednotka 18S rRNA.

### 6.6.10. Statistické vyhodnocení

Všechna měření byla statisticky vyhodnocena v programech Sigmaplot 9.01 a Sigmastat 3.1. Grafy jsou uváděny ve formátu průměrné hodnoty se střední chybou průměru.

V případě porovnání dvou skupin byl pro normálně rozložená data použit standardní t-test a pro data s nenormálním rozdělením byl použit neparametrický test.

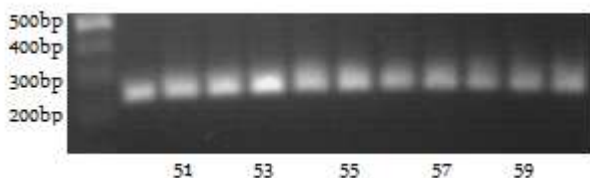
Kalibrační přímky byly vytvořeny pomocí lineární regrese.

## 7. Výsledky

### 7.1. Optimalizace kvantitativní PCR

Prvním krokem po obdržení navržených primerů a prób je jejich optimalizace. V případě použití hybridizačních prób je potřeba najít správnou nasedací teplotu primerů, koncentraci hořečnatých iontů ( $Mg^{2+}$ ) a zjistit výtěžnost PCR reakce (kalibrace). V případě použití interkalační barvy SYBRGREEN pro detekci signálu odpadá kalibrace hořečnatých iontů a zůstává jen zjistit optimální nasedací teplotu primerů a výtěžnost PCR reakce při této teplotě.

Testování nasedací teploty primerů bylo určováno metodou gradientové PCR. PCR reakce byla provedena dle postupu z kapitoly 6.4. Gradientová PCR. Všechny produkty z této reakce byly testovány agarózové elektroforéze. Příklad takového gelu je na obrázku 11. Gel byl následně vyhodnocen a vybrána teplota, při které měla PCR nejvyšší výtěžnost a při které nevznikaly nespecifické produkty.

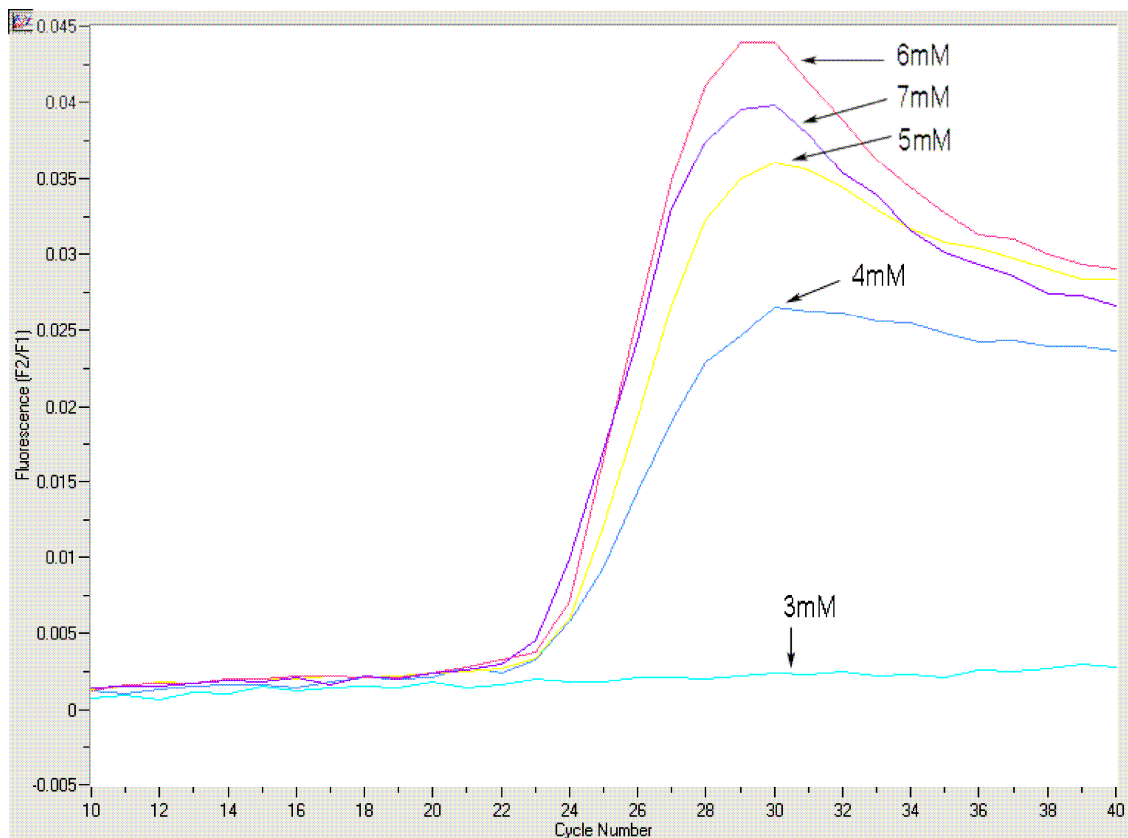


obrázek 11: Ukázka PCR produktů z gradientové PCR (agarózový gel, barveno EtBr). V tomto případě je optimální teploty dosaženo ve čtvrtém vzorku ( $53^{\circ}C$ )

Po výběru správné teploty byla testována fluorescence jednotlivých prób na změny koncentrace hořčíku. Pro nalezení optimálního množství  $Mg^{2+}$  byly použity koncentrace  $MgCl_2$  v rozmezí  $3mM$  až  $7mM$ . Tyto pokusy již probíhaly na přístroji Lightcycler a jejich příprava je uvedena v kapitole 6.6.6 provedení qPCR. Grafické znázornění průběhu takové reakce je uvedeno v obrázku 12. V tabulce č. 10 jsou znázorněny nasedací teploty a koncentrace  $MgCl_2$  jednotlivých amplikonů.

tabulka 10: Optimalizované nasedací teploty a koncentrace  $MgCl_2$  pro jednotlivé amplikony

	$T_A$ ( $^{\circ}C$ )	$C_{MgCl_2}$ (mM)
Potkan		
UCP2	57	4
UCP3	57	6
UCP4	55	4
UCP5	55	4
GAPDH	57	4
Myš		
UCP2	56	4
UCP3	54	4
UCP4	56	5
UCP5	56	5
GAPDH	56	4



obrázek 12: Příklad optimalizace koncentrace MgCl<sub>2</sub>.

Primery určené pro kvantifikaci UCP2 pomocí Sybrgreen byly testovány pouze gradientovou PCR a jejich optimální nasedací teploty jsou 58°C.

## 7.2. Kalibrační přímky

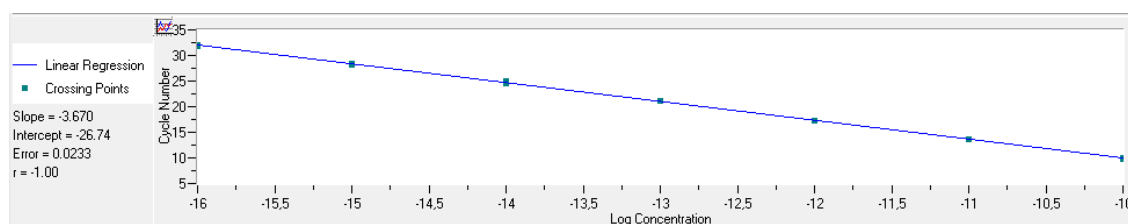
Pro každý amplikon byla vytvořena kalibrační přímka. Důležitou podmínkou kalibrace je, aby amplifikační protokol odpovídal experimentálním podmínkám, které budou používány při kvantifikacích jednotlivých genů. Kalibrační série byly vytvořeny ředěním PCR produktu daného genu a to tak, že rozdíl mezi každým ředěním byl jeden řád. Celkem bylo oměřeno sedm až osm ředění, vždy v duplikátech nebo v triplikátech. Jednotlivé kalibrační přímky jsou uvedeny v tabulkách 11. a 12.

tabulka 11: Kalibrační přímky pro amplikony myši a potkana

Potkan	Kalibrační přímka	součin čtverců
UCP2	$y = -3,5428x - 20,837$	$R^2 = 0,9948$
UCP3	$y = -2,8713x - 16,946$	$R^2 = 0,9969$
UCP4	$y = -3,2822x - 18,727$	$R^2 = 0,997$
UCP5	$y = -3,1725x - 18,146$	$R^2 = 0,9896$
GAPDH	$y = -3,5428x - 20,841$	$R^2 = 0,9952$
Myš		
UCP2	$y = -3,3408x - 18,569$	$R^2 = 1$
UCP3	$y = -3,4697x - 16,052$	$R^2 = 0,9984$
UCP4	$y = -3,4697x - 16,053$	$R^2 = 0,9985$
UCP5	$y = -3,5366x - 16,892$	$R^2 = 0,992$
GAPDH	$y = -3,5428x - 20,847$	$R^2 = 0,9958$

tabulka 12: Kalibrační přímky pro amplikony potkana značené SYBRGEEN

Potkan	Kalibrační přímka	součin čtverců
UCP2	$y = -3,503 - 26,62$	$R^2 = 1$
GAPDH	$y = -3,670 - 26,74$	$R^2 = 1$



obrázek 13: Ukázka kalibrační přímky vyhodnocené Lightcycler software version 3.5.17

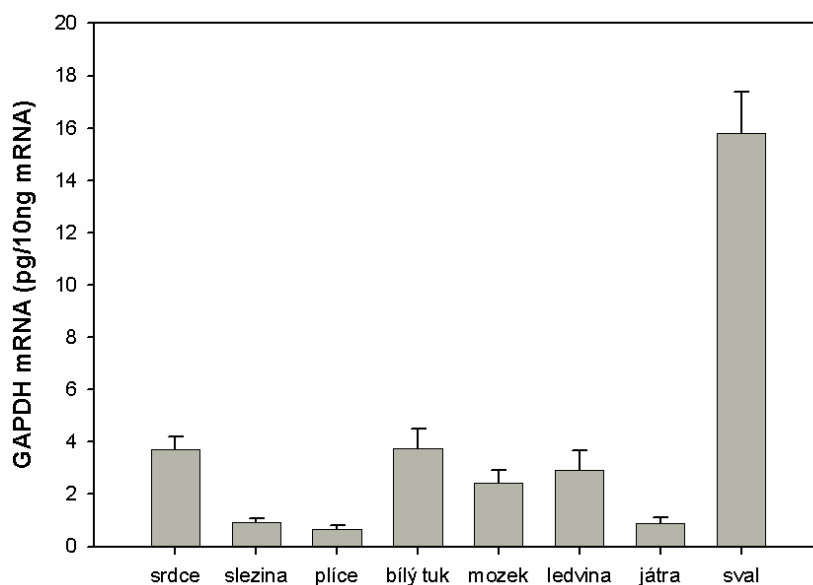
### 7.3. Kvantifikace odpřahujících proteinů v jednotlivých tkáních myši a potkana

Kvantifikace odpřahujících proteinů ve vybraných tkáních myši a potkana tvoří hlavní část této diplomové práce. Bylo vybráno osm tkání a v nich byly stanoveny hladiny transkripce jednotlivých izoform odpřahujících proteinů. Těmito vybranými tkáněmi jsou *srdce*, *slezina*, *plíce*, *bílý tuk*, *mozek*, *ledvina*, *játra* a *sval*. Jsou to všechno snadno vyseparovatelné tkáně s relativně vysokými výtěžky mRNA při jejich izolaci. Data v této části práce pocházejí z kontrolních potkanů a myší, jejichž kmeny jsou uvedeny v kapitole 6.2.1. Modelové organismy. Uvedené hodnoty jsou uvedeny po normalizaci na housekeeping gen GAPDH, který vykazoval v jednotlivých tkáních ustálené hodnoty (viz graf 1 a 2). Množství mRNA sledovaných genů je vyjádřeno v *pg* vzhledem k celkovému množství mRNA

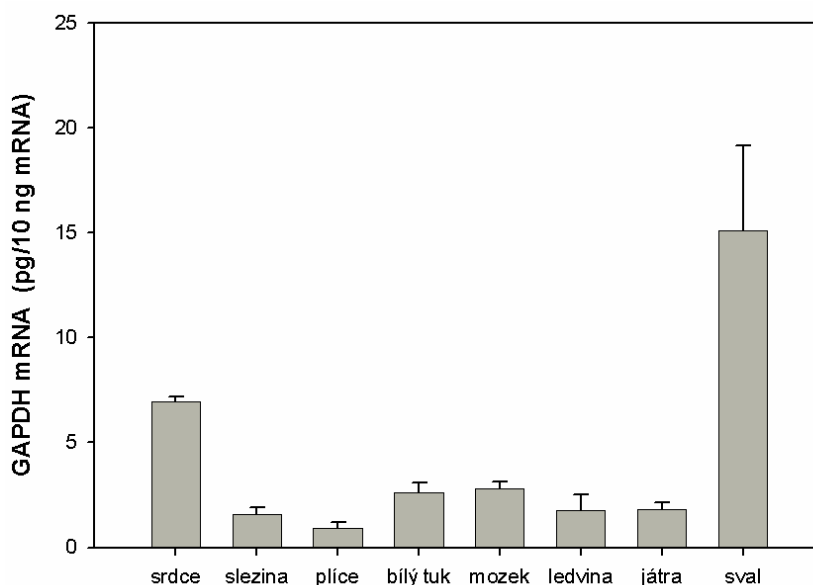
v reakci. V grafech jsou uvedeny průměry se standardní chybou průměru a počet izolací se pohybuje mezi třemi až pěti izolacemi.

### 7.3.1. Bazální hladiny housekeeping genu GAPDH

V grafech 1 a 2 jsou uvedeny bazální hladiny GAPDH mRNA, který sloužil jako housekeeping gen. Jak je vidět z těchto grafů, jeho hodnoty vykazovaly v rámci dané tkáně velice vysoké homogenity (velice malé chybové úsečky střední chyby průměru). Této vlastnosti jsme využili a použili jej jako standard pro normalizaci. Jeho nejvyšší hladiny byly naměřeny podle očekávání ve svalu, srdci a bílém tuku. Důležitým poznatkem také je, že hladiny exprese tohoto genu u myši a potkana vykazují mezi jednotlivými tkáněmi stejný expresní profil.



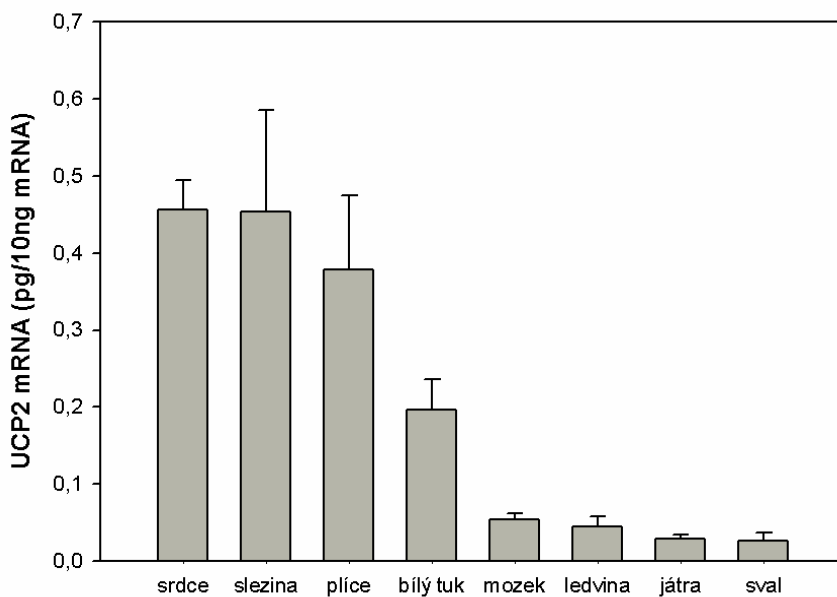
Graf 1: Množství GAPDH transkriptu ve vybraných tkáních potkana



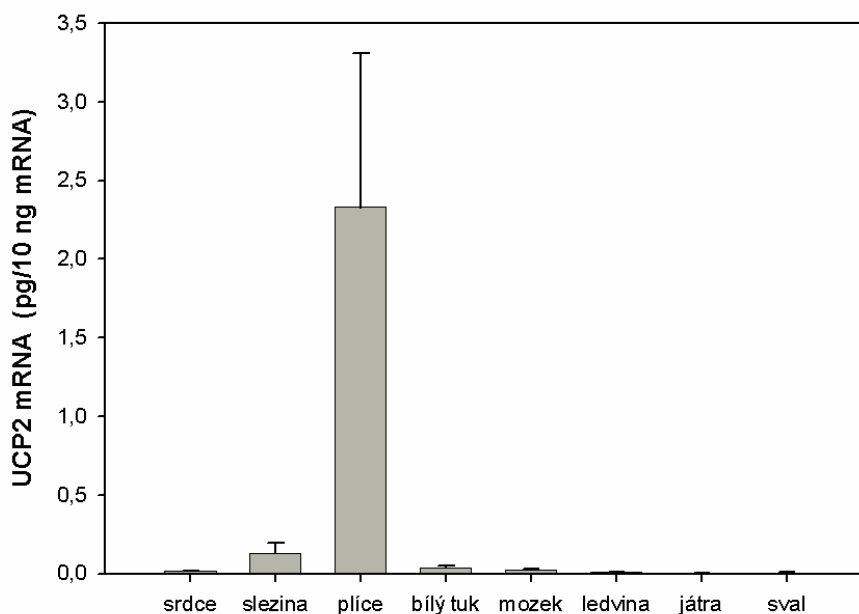
Graf 2: Množství GAPDH transkriptu ve vybraných tkáních myši

### 7.3.2. Bazální hladiny UCP2 mRNA

UCP2 je z hlediska tkáňové distribuce považován za velice abundantní protein s širokým spektrem funkcí. Tento poznatek byl však potvrzen pouze v tkáních potkana, kde byla nejvyšší exprese zaznamenána v tkáních srdce, sleziny a plic. K nim se blíží tkáň bílého tuku a s velkým odstupem přibližně jednoho řádu následuje mozek, ledvina, játra a sval. Naproti tomu mRNA izoláty myších tkání ukázaly úplně jiný transkripční profil. Transkripce *ucp2* genu byla ve většině tkání, s výjimkou sleziny a plic, potlačena na minimum. V myších plicích však množství UCP2 mRNA několikanásobně přesahovala množství UCP2 mRNA v tkáních potkana a také signifikantně ( $p=0,009$ ) přesáhla množství vlastního housekeeping genu GAPDH.



Graf 3: Množství UCP2 transkriptu ve vybraných tkáních potkana

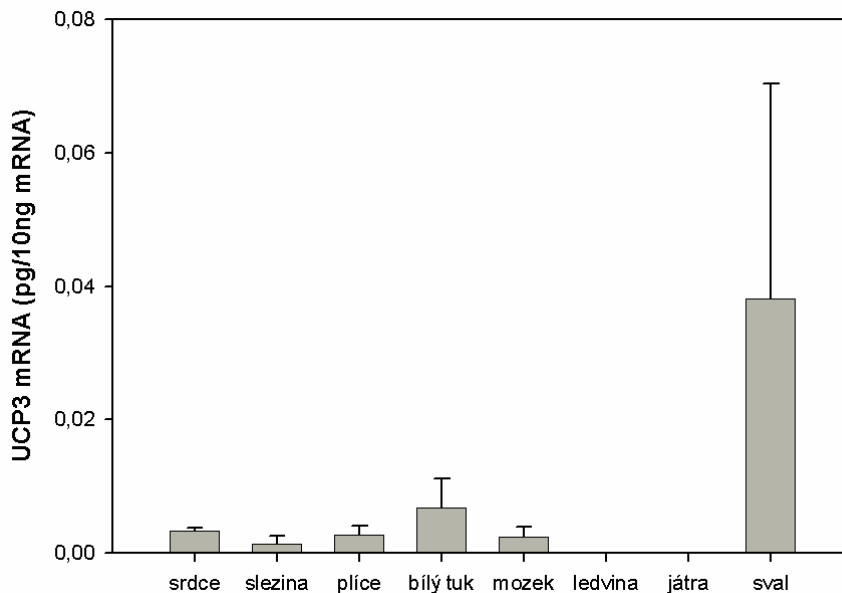


Graf 4: Množství UCP2 transkriptu ve vybraných tkáních myši

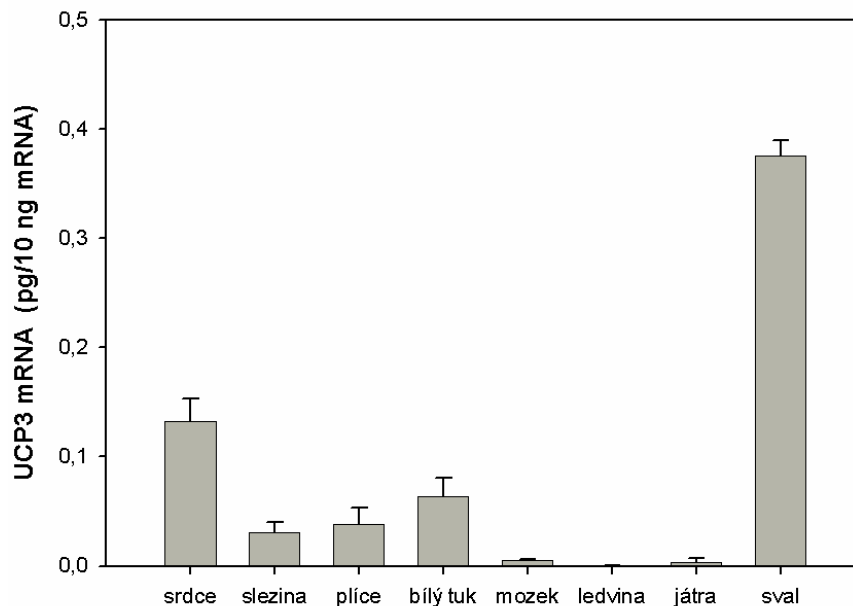


### 7.3.3. Bazální hladiny UCP3 mRNA

Množství třetího odpráhuujícího proteinu v tkáních potkana a myši jsou znázorněny v grafech 5 a 6. Podle očekávání je UCP3 transkribován u myši i potkana nejvíce ve svalu. S velkým odstupem následují tkáň bílého tuku a srdce. Při porovnání absolutních hodnot transkripce UCP3 byla zjištěna o řád vyšší transkripce UCP3 mRNA u myši než u potkana.



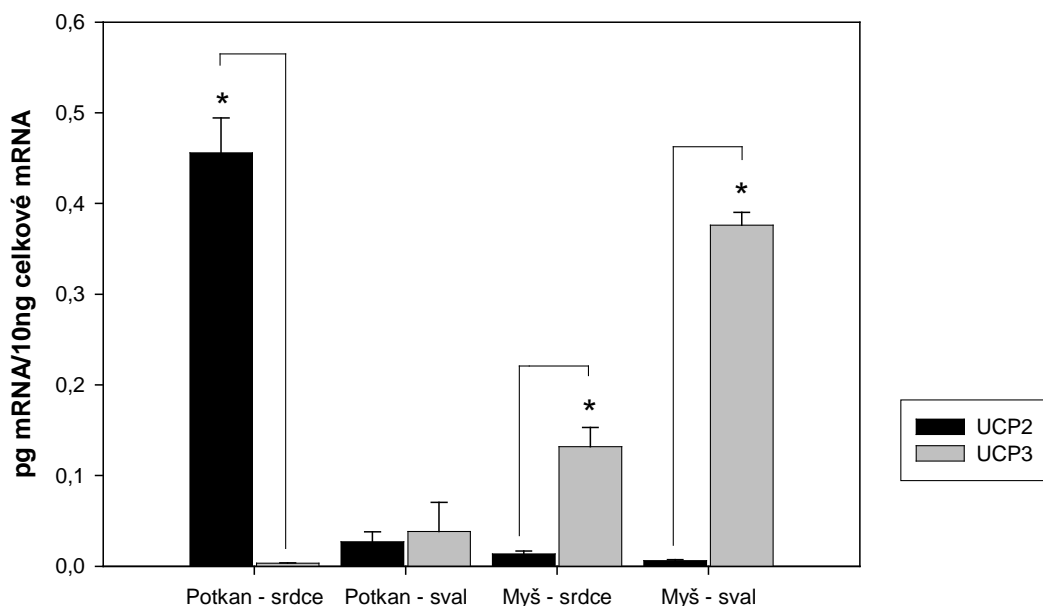
Graf 5: Množství UCP3 transkriptu ve vybraných tkáních potkana



Graf 6: Množství UCP3 transkriptu ve vybraných tkáních myši

Z porovnání hodnot transkripce UCP2 a UCP3 v tkáních srdce a svalu pro myš a potkana vyplývá zajímavá skutečnost. A to, že v srdci potkana je signifikantně ( $p=0,001$ ) dominantní druhý odpráhuující protein. Ve svalu potkana jsou oba proteiny zastoupeny přibližně stejně. V srdci a svalu myši je tomu

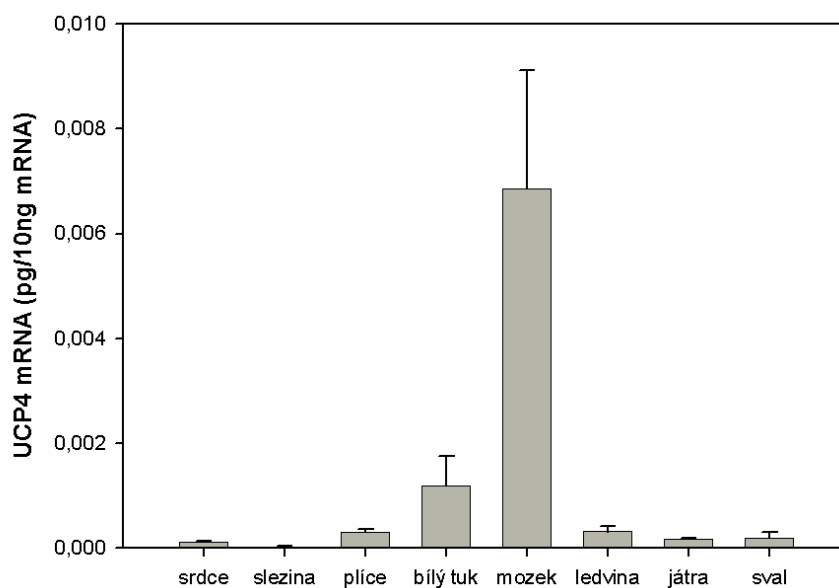
naopak. Myší srdeční a svalová tkáň má signifikantně více UCP3 mRNA než UCP2 mRNA ( $p=0,005$ ), respektive ( $p=0,001$ ).



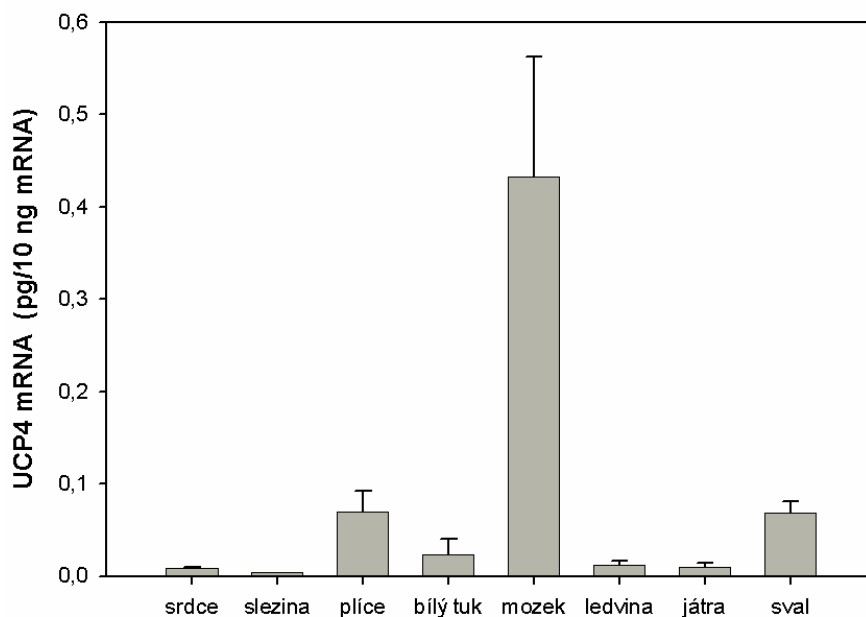
Graf 7: Porovnání absolutních hodnot transkripce druhého a třetího odpráhujícího proteinu ve svalů a v srdci

### 7.3.4. Bazální hladiny UCP4 mRNA

Čtvrtý odpráhující protein je popisován jako protein exprimovaný především v mozku. Tento fakt byl potvrzen i v mých měřeních a jednotlivé hodnoty jsou uvedeny v grafech 8 a 9. Expresí genu *ucp4* u potkana je téměř o dva řády nižší než u myši.



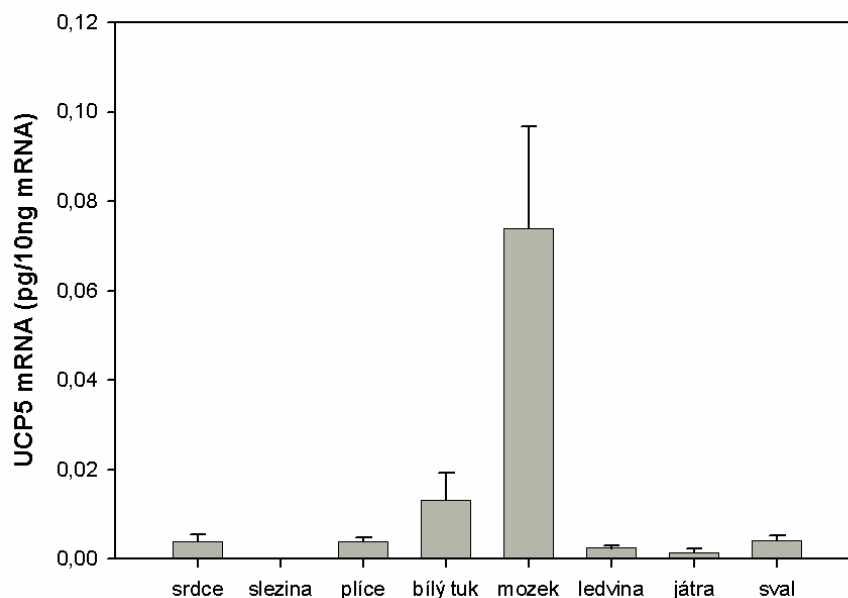
Graf 8: Množství UCP4 transkriptu ve vybraných tkáních potkana



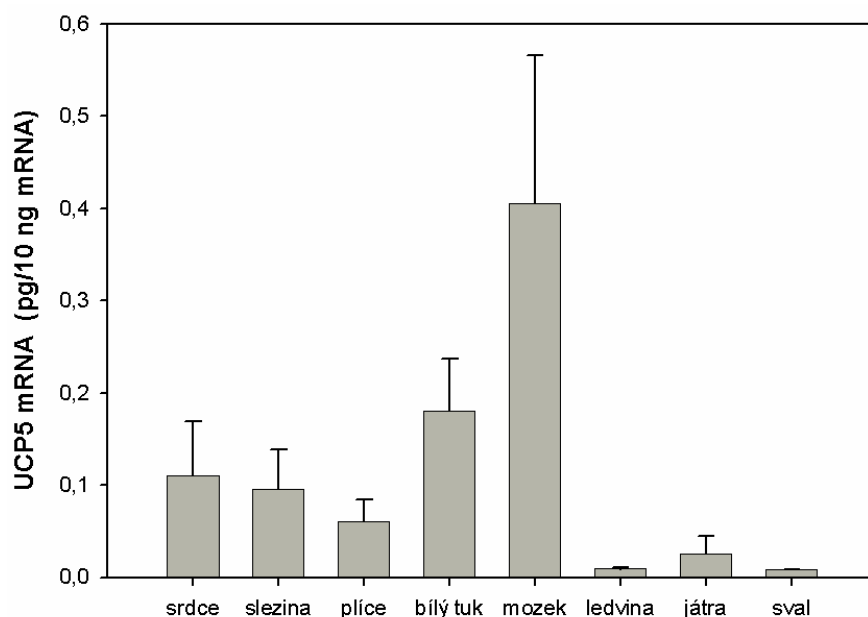
Graf 9: Množství UCP4 transkriptu ve vybraných tkáních myši

### 7.3.5. Bazální hladiny UCP5 mRNA

V grafech 10 a 11 jsou znázorněny množství UCP5 mRNA v tkáních myši a potkana. Opět vycházely nejvyšší hodnoty u mozku. U myši pak byly naměřeny vysoké hodnoty pro tkáň srdce, sleziny a bílého tuku.



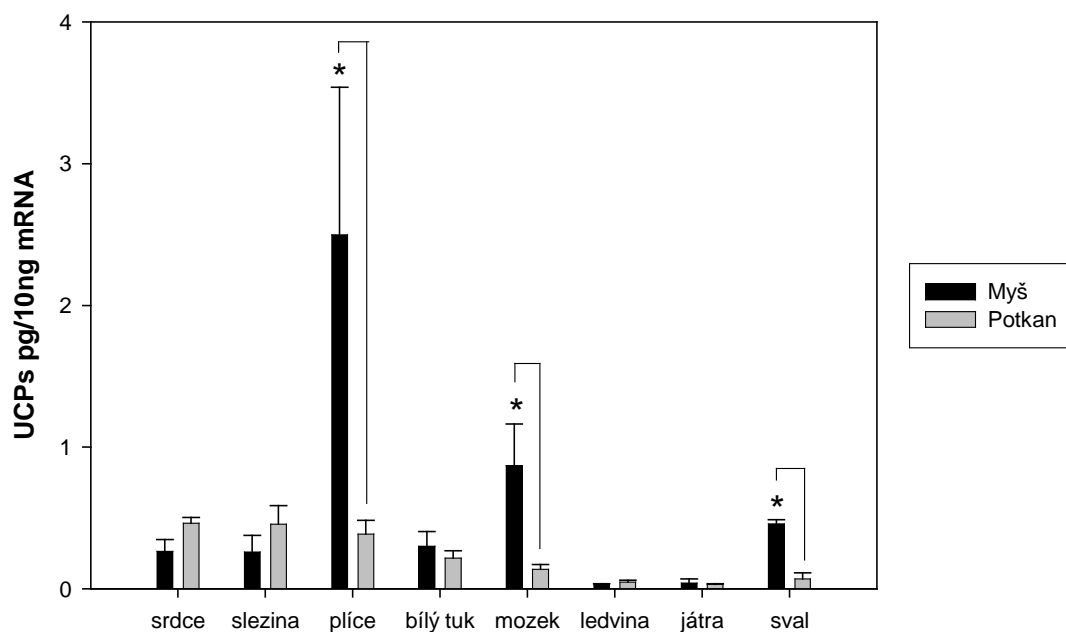
Graf 10: Množství UCP5 transkriptu ve vybraných tkáních potkana



Graf 11: Množství UCP5 transkriptu ve vybraných tkáních myši

### 7.3.6. Srovnání bazálních hladin sumy odpřahujících proteinů

Graf 12 znázorňuje sumu všech UCP mRNA naměřených v jednotlivých tkáních. Při porovnání myši a potkana můžeme pozorovat u většiny tkání podobné hodnoty celkové exprese UCP. Výjimkou, však jsou tkáně plic, mozku a svalů, u kterých dosahuje myš několikanásobně vyšší množství tohoto parametru. V každé z těchto tkání je rozdíl způsoben jiným proteinem. V plicích je suma myší UCP2 mRNA vyšší ( $p=0,09$ ) než u potkana. V mozku je signifikantní rozdíl mezi myší a potkanem ( $p=0,038$ ) u dvojice UCP4 a UCP5 mRNA. A konečně ve svalu tento signifikantní rozdíl ( $p=0,001$ ) vytváří UCP3 mRNA.



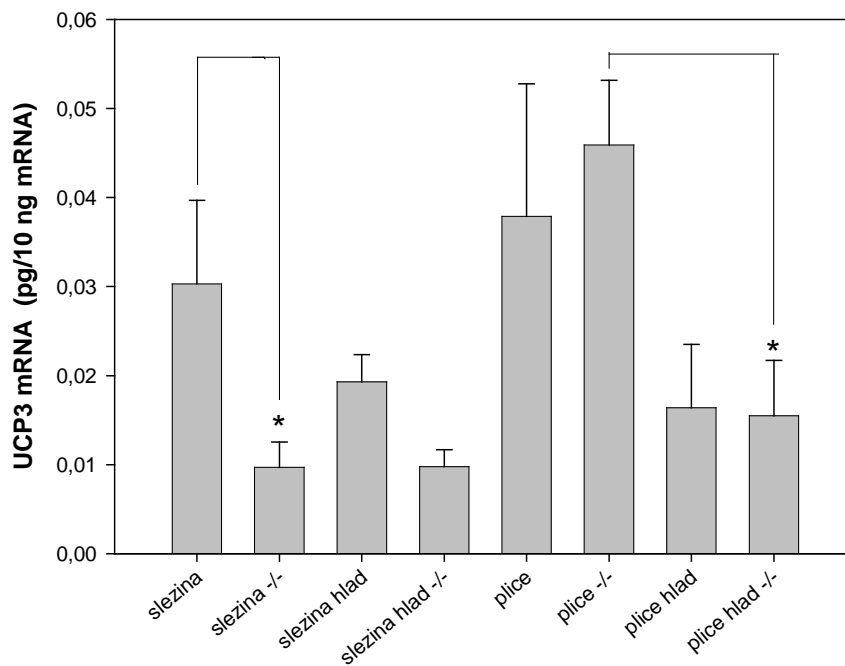
Graf 12: Suma odpřahujících proteinů jednotlivých tkání myši a potkana

#### 7.4. Vliv hladovění na expresi odpřahujících proteinů u *ucp2*<sup>-/-</sup> myši

V této části práce jsou shrnuty výsledky z wild-type (wt) a *ucp2* knock out (*-/-*) myši. Tyto myši byly rozděleny do 4 skupin po třech zvířatech. Dvěma skupinám, wt a *ucp2*<sup>-/-</sup> myším, byla odebrána potrava na dobu 24 hodin a dvě skupiny dostávaly po tuto dobu potravu ad libitum. Po uplynutí 24 hodin byla zvířata v anestezii utracena dekapitací a byly jim odebrány tkáně plic a sleziny. Hladiny mRNA jsou uvedeny v absolutních hodnotách. V grafech jsou uvedeny průměry se standardní chybou průměru a počet izolací se pohybuje mezi třemi až čtyřmi izolacemi.

### 7.4.1. Efekt hladovění na expresi UCP3 u *ucp2* *-/-* a kontrolních myší

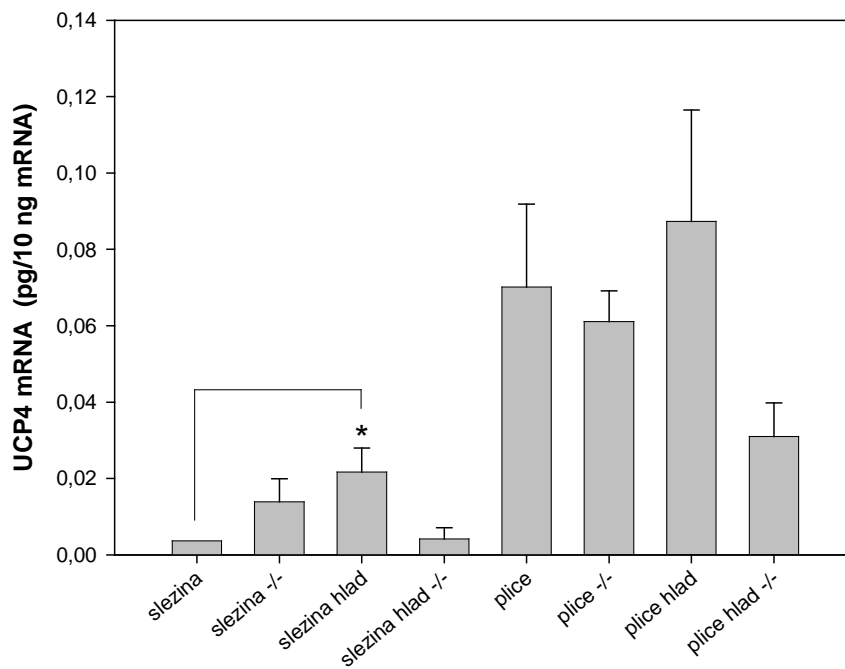
Ve slezině nedochází ke zvýšení transkripce *ucp3* genu po hladovění a dokonce ani u *ucp2* knock-outové myši. Naopak při porovnání izolátů sleziny normálně krmených myší dochází u *ucp2* *-/-* myši ke snížení transkripce UCP3 mRNA ( $p=0,081$ ). V plicích také nedošlo k předpokládanému zvýšení transkripce UCP3. Signifikantní pokles *ucp3* transkripce byl zaznamenán v plicích hladovějících knock-out myší ( $p=0,033$ ).



Graf 13: UCP3 mRNA ve slezině a plicích po hladovění v kontrolní a *ucp2* *-/-* myši

### 7.4.2. Efekt hladovění na expresi UCP4 u *ucp2* <sup>-/-</sup> a kontrolních myší

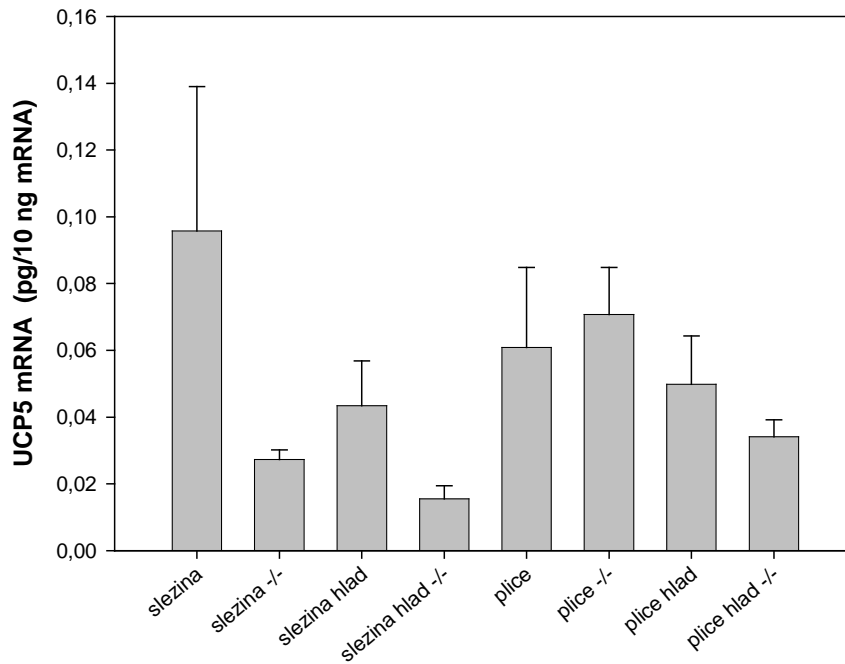
UCP4 mRNA ve slezině kontrolních myší se po hladovění signifikantně zvýšila ( $p=0,018$ ). Vůči kontrolním myším byla zvýšena také hladina UCP4 mRNA u knock-outové myši ( $p=0,098$ ). U *ucp2* <sup>-/-</sup> myši došlo však po hladovění ke snížení UCP4 transkripce, které ale nebylo na daném počtu pozorování signifikantní. Střední hodnota i průměr však byly snížené. V plicích zůstala exprese *ucp4* téměř stejná. Jediný větší pokles UCP4 mRNA v plicích byl pozorován u knock-outové myši, která byla hladověna a porovnána s nehladověnou *ucp2* knock-out myší ( $p=0,065$ ).



Graf 14: UCP4 mRNA ve slezině a plicích po hladovění v kontrolní a *ucp2* <sup>-/-</sup> myši

### 7.4.3. Efekt hladovění na expresi UCP5 u *ucp2* *-/-* a kontrolních myší

Ve slezině kontrolních myší došlo po hladovění k poklesu exprese UCP5 mRNA. Pokles však nebyl na tak malém počtu měření signifikantní. Bylo však pozorováno snížení střední hodnoty i průměru. U porovnání exprese UCP5 mRNA u nehladovějící kontroly a *ucp2* *-/-* myši vidíme, že dochází také k poklesu exprese UCP5 mRNA ( $p=0,1$ ). V plicích nedošlo k žádným prokazatelným změnám. Jedinou změnou v *ucp5* transkripci plic je snížení průměru a střední hodnoty po hladovění u *ucp2* *-/-* myši.

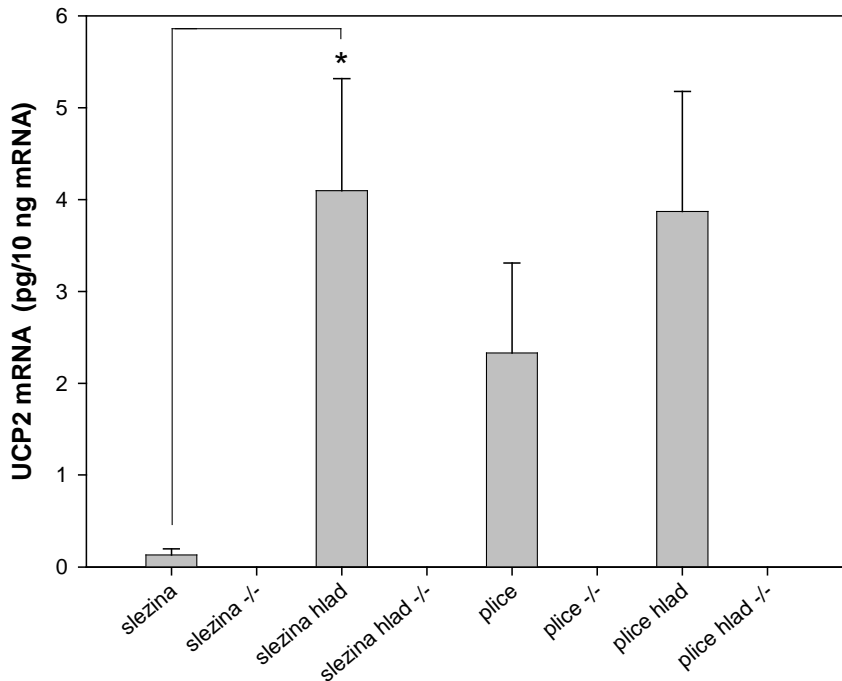


Graf 15: UCP5 mRNA ve slezině a plicích po hladovění v kontrolní a *ucp2* *-/-* myši



#### 7.4.4. Efekt hladovění na expresi UCP2 u *ucp2* <sup>-/-</sup> a kontrolních myší

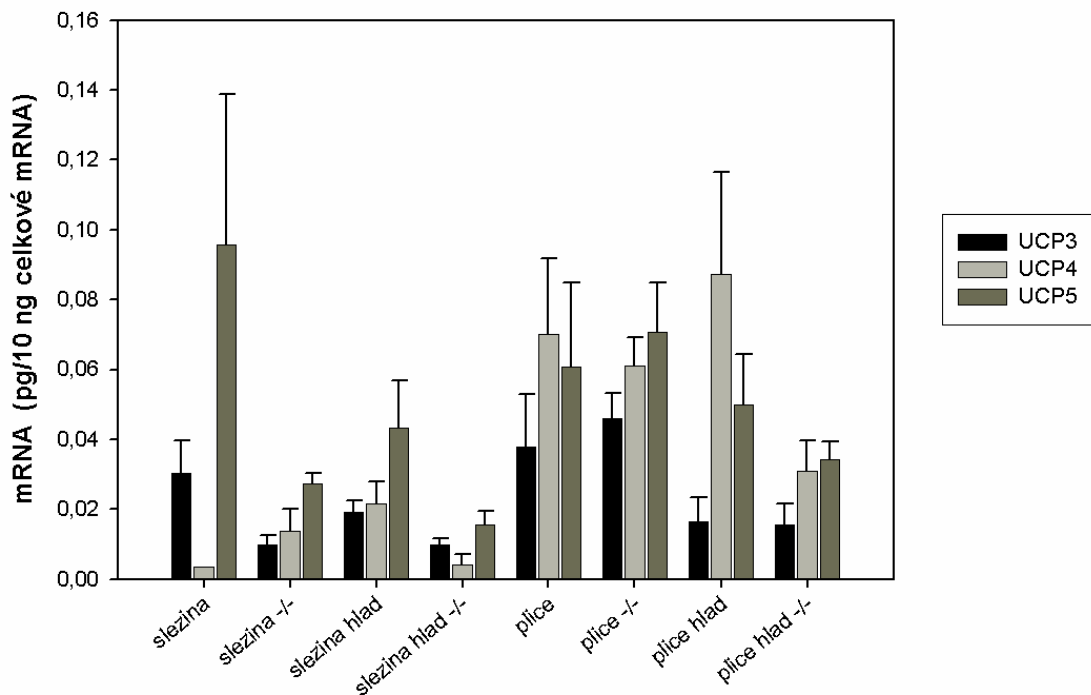
Při stanovování exprese UCP2 mRNA bylo prokázáno, že *ucp2* knock-outové neexprimují UCP2 mRNA. Dále byla také prokázána signifikantně vyšší exprese UCP2 mRNA po hladovění ve slezině ( $p=0,032$ ). V plicích byla UCP2 mRNA po hladovění také zvýšená (vyšší střední hodnota i průměr).



Graf 16: UCP2 mRNA ve slezině a plicích po hladovění v kontrolní a *ucp2*<sup>-/-</sup> myši

### 7.4.5. Souhrn exprese genů *ucp3*, *ucp4* a *ucp5* před a po hladovění

V grafu 17 jsou shrnuty hladiny mRNA třetího, čtvrtého a pátého odpřahujícího proteinu. Druhý odpřahující protein je znázorněn v grafu 16, jelikož jeho hodnoty byly neporovnatelně vyšší než hodnoty zbylých izoforem. Z těchto hodnot je vidět, že žádný ze zbylých odpřahujících proteinů (UCP3, UCP4 a UCP5) prokazatelně nenahrazuje druhý odpřahující protein.

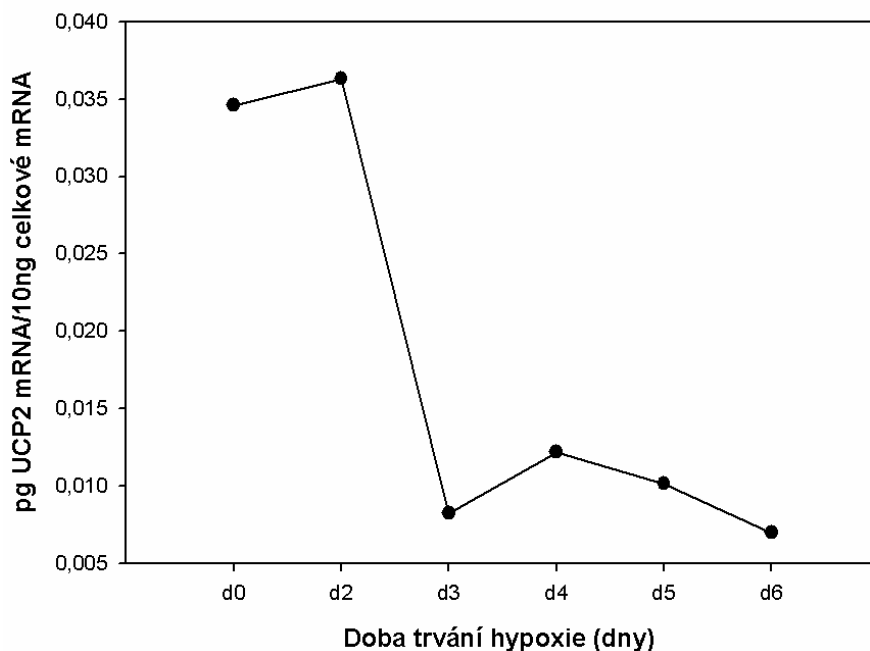


Graf 17: Souhrn UCP3, UCP4 a UCP5 mRNA ve slezině a plicích po hladovění v kontrolní a *ucp2*<sup>-/-</sup> myši

### 7.5. Změna exprese UCP2 vlivem sníženého parciálního tlaku O<sub>2</sub> v kultivační atmosféře

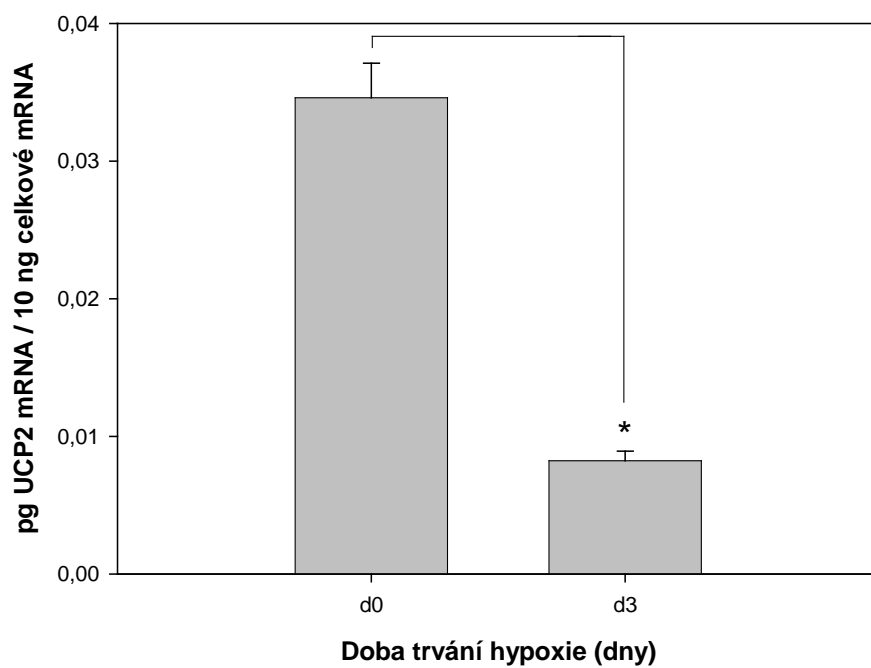
Posledním měřeným projektem bylo stanovení hladin transkripce UCP2 v tkáňových kulturách INS-1E potkaní linie. Nejprve byla proměřena časová řada, kdy bylo naseto šest středních kultivačních nádob (75cm<sup>2</sup>) INS-1E buněk (narostlé na cca 80% kultivační plochy). Tento krok byl proveden u buněk kultivovaných při atmosferickém parciálním tlaku kyslíku a 5% CO<sub>2</sub> a nasycené vodní páry. Buňkám bylo vyměněno médium a následně byly přesunuty do hypoxického boxu, kde byla kultivační atmosféra 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> a zbývající objem byl vyplněn N<sub>2</sub> a vodními parami. Od druhého dne byly podle časové křivky odebírány buňky. Buňky byly v hypoxickém boxu ošetřeny trypsinem, vyjmuty z boxu a centrifugovány tři minuty při 1.000x g. Následně byly buňky zamrazeny při -80°C. RNA byla izolována současně až po zamražení všech vzorků.

Graf 18 popisuje časovou křivku vystavení INS-1E potkání tkáňové linie nízkému kyslíku v kultivační atmosféře. Z grafu je patrné, že k největšímu propadu transkripce UCP2 mRNA dochází třetí den. Poté dojde ke stabilizaci exprese UCP2 mRNA na hladině, která je přibližně 3,5krát nižší než při kultivaci v atmosféře s 21% kyslíkem (viz graf 19).



Graf 18: Časová křivka závislosti transkripce UCP2 mRNA na délce vystavení hypoxii

V grafu 19 je doplněno měření o další dva pokusy. Třetí den dochází v atmosféře s 5% kyslíkem k signifikantnímu snížení exprese UCP2 mRNA ( $p=0,001$ ).



Graf 19: Porovnání transkripce UCP2 mRNA u kontrolních buněk a po třech dnech v nízkém kyslíku

## 8. Diskuze

### 8.1. Kvantifikace bazálních hladin UCP mRNA vybraných tkání myši a potkana

Odpřahující proteiny (UCP) lze jen velmi obtížně kvantifikovat na úrovni proteinů. Při imunosemikvantifikaci je hlavním problémem nedostatečná specifita a zkřížená reaktivita UCP protilátek při blotování. Komerčně prodáváné protilátky, totiž nasedají na všechny odpřahující proteiny a navíc se vážou také na další membránové přenašeče rodiny MACF (mitochondrial anion carrier protein superfamily) (Borecky *et al.*, 2001). Z těchto důvodů se kvantifikace transkripce těchto proteinů stala klíčovou pro odhadování jejich množství na proteinové úrovni. Otázkou ovšem zůstává, zda dochází vždy ke korelaci množství mRNA a proteinu u takto málo exprimovaných proteinů (Pecqueur *et al.*, 2001).

První práce, které se pokoušely kvantifikovat mRNA těchto proteinů, využívaly metody northern blot. Tato metoda však není dostatečně spolehlivá a kvantifikace není přesná. Použití real-time qPCR by mělo všechny tyto nevýhody odstranit. Jelikož specifita je určena nejen primerovým párem, ale navíc párem hybridizačních prób, nasedajících pouze na amplicon vzniklý z mRNA. Navíc díky možnosti sledování rychlosti qPCR získáváme tzv. výtěžnost reakce, z níž dokážeme velice přesně zjistit počet molekul cDNA potažmo mRNA na počátku reakce.

V roce 1997 byl publikován jeden z prvních článků popisující distribuci UCP2 a UCP3 mRNA v tkáních potkana. UCP2 mRNA byla kvantifikována metodou northern-blot a nejvyšší hladiny byly naměřeny v plicích, svalu a srdci. Následovaly tkáně bílého tuku, varlat s nižší úrovní transkripce a tkáň hnědého tuku, ledvin a mozku (Gong *et al.*, 1997). O tři roky později byla pomocí stejné metody publikovaná podobná studie provedená na myších tkáních. V této publikaci byly stanoveny nejvyšší hladiny transkripce UCP2 mRNA v plicích, slezině a bílé tukové tkáni. Několikanásobně nižší hladiny byly naměřeny v tkáních hnědého tuku, ledvin, mozku, srdce, jater a svalu (seřazeno sestupně) (Ricquier a Bouillaud, 2000). Další práce sledovaly jen některé vybrané tkáně a nejsou mezi sebou porovnatelné. V novějších publikacích jsou UCP2 mRNA kvantifikovány metodou RT-PCR. Lengacher a kolegové kvantifikovali UCP2 mRNA ve třech tkáních myši. Nejvyšší hodnotu exprese identifikovali v hnědé tukové tkáni, pak následoval kosterní sval a nejnižší hladina exprese byla v mozkové kůře (Lengacher *et al.*, 2004). UCP2 mRNA byla měřena pomocí RT-PCR také u potkana. Identifikovaná mRNA byla přepočítávána na množství 18S rRNA a nejvyšších hodnot dosahovala z měřených tkání ve svalu, mozku, bílém tuku a nejméně v játrech (Zhang *et al.*, 2009). Publikací, zabývajících se kvantifikací odpřahujících proteinů, bylo již napsáno velké množství. Chybí však souhrné stanovení exprese těchto izoform odpřahujících proteinů v absolutním množství a porovnání expresí mezi myší a potkanem. Bylo také zapotřebí upřesnit ty výsledky, které se v předchozích publikacích neshodují.

Moje práce potvrdila vysokou abundanci UCP2 mRNA v tkáních potkana. Nejvíce UCP2 mRNA bylo naměřeno v srdci, slezině a plicích. Nižší transkripci UCP2 měla tkáň bílého tuku a nejnižší hodnoty byly u mozku, ledviny, jater a svalu. Naměřené hladiny korelují s dříve publikovanými výsledky vědecké skupiny Gong a kolektivu (*Gong et al., 1997*). Jediný rozdíl byl nalezen u svalové tkáně, kde bylo očekávané přibližně stejné množství jako u sleziny. Tento rozdíl může být nedostatečnou specifikou radioaktivně značené próby v důsledku vysoké podobnosti transkriptů UCP. U myších tkání jsem potvrdil vysokou hladinu UCP2 mRNA v tkáni plic, pak následovaly tkáně sleziny a bílého tuku s asi 10krát nižší hladinou transkripce této mRNA. Nejnižší hladiny UCP2 mRNA byly nalezeny v srdci, mozku, ledvinách, játrech a ve svalu. Naměřené hodnoty opět korespondují s již publikovanými výsledky Ricquiera a Bouillanda s výjimkou sleziny. Slezina a plíce však patří mezi tkáně s vysokým obsahem buněk imunitního systému, které exprimují vysoké množství UCP2 mRNA (*Arsenijevic et al., 2000*). Migrací imunitních buněk organismem by mohlo docházet k ovlivnění množství UCP2 mRNA naměřených v těchto tkáních.

Při porovnání tkáňové exprese UCP2 mRNA myši a potkana je vidět, že se tyto dva organismy odlišují. Největší rozdíly najdeme v expresi UCP2. Ta je vysoce abundantní v myší plicní tkáni, zatímco v ostatních tkáních je transkripce UCP2 mRNA potlačena. Naproti tomu u potkana je UCP2 rovnoměrněji zastoupeno ve většině tkání. Tento jev by mohl naznačovat nějakou vývojovou specializace UCP2 proteinu v plicích myši, která je dána buď vysokým množstvím buněk imunitního systému nebo specifická pro samotnou plicní tkáň. Ve zbylých tkáních myši by UCP2 mohl být nahrazen zbývajícími třemi izoformami (viz dále).

UCP3 mRNA byla nalezena u obou sledovaných organismů pouze ve svalu, hnědé tukové tkáni a v malém množství v bílé tukové tkáni. V žádných jiných tkáních nebyl northern blottingem potvrzen výskyt UCP3 mRNA (*Ricquier a Bouillaud, 2000; Gong et al., 1997*). Kvantifikace metodou RT-PCR potvrdila výskyt UCP3 mRNA v myších tkáních svalu, mozku a hnědého tuku (*Lengacher et al., 2004*). V tkáních potkana byla touto metodou nalezena nejvyšší exprese UCP3 mRNA v tkáních svalu a hnědého tuku. Tato mRNA byla také detekována v mozku, bílém tuku a játrech (*Zhang et al., 2009*).

Jednoznačně nejvyšší hladinu UCP3 mRNA jsem u potkana identifikoval ve svalu. Z dalších tkání byla UCP3 mRNA detekována v bílé tukové tkáni, srdci, plicích, mozku a ve slezině. V játrech byla minimální transkripce tohoto genu a v ledvině nebyla nalezena vůbec. Došlo tedy k potvrzení již publikovaných dat. Navíc byla, díky citlivosti použité metody, zjištěna exprese UCP3 mRNA v tkáních plic a sleziny. V tkáních myši byla abundace UCP3 mRNA jednoznačně vyšší než u tkání potkana. Vyšší bylo také absolutní množství této mRNA v jednotlivých tkáních. Stejně jako u potkana se UCP3 mRNA nejvíce transkribuje ve svalu. S odstupem následuje transkripce UCP3 mRNA v srdci, bílém tuku, plicích a slezině. Nejméně UCP3 mRNA bylo detekováno v mozku, játrech a ledvině. Ačkoliv je UCP3 považován za typický odpráhuující protein svalové tkáně, tak při srovnání absolutních množství UCP3 a UCP2 v tkáních kosterního a srdečního svalu vyplývá, že v potkaních svalových vláknecích je velice důležitý právě UCP2. V srdečním svalu převyšuje transkripci UCP3 přibližně o dva řády a

v kosterním svalu jsou hladiny mRNA těchto dvou proteinů téměř identické. Svalové tkáně myši, však prvně zmiňovanou hypotézu o exkluzivitě UCP3 ve svalech potvrzují. Množství UCP3 mRNA v srdečním i kosterním svalu několikanásobně převyšuje množství UCP2 mRNA.

UCP4, ač fylogeneticky nejstarší, je nejméně známý odpřahující protein. Na základě detekcí northern blottem byl určitou dobu považován za výhradně mozkový protein (*Mao et al., 1999*). Později, metodou PCR byla UCP4 mRNA nalezená také v dalších tkáních. A to ve svalu, játrech a bílé tukové tkáni potkana (*Zhang et al., 2009*).

Tato práce potvrzuje nejvyšší transkripci UCP4 mRNA v mozku potkana. Po něm následuje s nižší hladinou této mRNA tkáň bílého tuku a dále s minimálními hladinami UCP4 mRNA jsou tkáně plic, ledviny, svaly, jater, srdce a sleziny. V myších tkáních byly naměřené hladiny UCP4 mRNA asi o řád vyšší. Nejvíce bylo této mRNA naměřeno opět v mozku, pak následovala tkáň plic a svaly. UCP4 mRNA byla také detekována v bílém tuku, srdci, ledvině, játrech a slezině. Tyto hodnoty však byly mnohem nižší než u prvních tří uvedených tkání. Bylo tedy potvrzeno dominantní postavení mozku v expresním profilu UCP4 mRNA. Transkripce této mRNA byla nově detekována také v tkáních, kde její transkripce nebyla dosud publikována. Na základě nově vyvinuté protilátky proti UCP4, však bylo dokázáno, že v některých výše uvedených myších tkáních nedochází k translaci tohoto proteinu. UCP4 se nenacházel v slezině, plicích, kosterním svalu ani v bílé tukové tkáni. Jediným místem jeho exprese byl mozek (*Smorodchenko et al., 2009*), což bylo očekáváno již u prvních studií (*Mao et al., 1999*).

UCP5 je označován stejně jako UCP2 za velice abundantní protein. Jako hlavní místo jeho exprese je označována mozková tkáň. V dalších tkáních by se měl vyskytovat v nižších množstvích. Potkan má tedy nejvyšší expresi UCP5 mRNA v mozku, pak následují sestupně další tkáně jako plíce, ledviny, srdce, bílá tuková tkáň a sval. Myš má také nejvyšší množství UCP5 mRNA v mozku a několikanásobně nižší hladiny najdeme v tkáních ledvin, bílého tuku a srdce (*Sanchis et al., 1998*). Metodou RT-PCR bylo dosaženo podobných dat u myši (*Lengacher et al., 2004*). U potkana bylo touto metodou objevena přítomnost UCP5 mRNA i v játrech (*Zhang et al., 2009*)

Moje výsledky potvrdily tkáňovou abundanci a vysokou mozkovou transkripci UCP5 mRNA u obou sledovaných organismů. Potkan měl nejvyšší transkripci UCP5 mRNA v mozku. 7x méně jej bylo v bílé tukové tkáni. V dalších tkáních bylo UCP5 mRNA o dva řády méně než v mozku. Z myších tkání měla opět nejvyšší hladinu UCP5 mRNA mozková tkáň. Následovala dvakrát nižší hladina v tkáni bílého tuku a 4x nižší hladina UCP5 mRNA u tkání srdce, sleziny a plic. V dalších tkáních byla exprese této mRNA 20x až 100x nižší. Při porovnání absolutních hodnot těchto dvou organismů měla opět myš v průměru asi o řád vyšší hodnoty transkripce UCP5 mRNA než potkan.

Porovnání součtu UCP mRNA v jednotlivých tkáních potkana a myši ukázalo přibližně stejný transkripční profil. Výjimkou byly tkáně plic, mozku a svaly. Ve všech třech případech byla vyšší transkripce těchto proteinů v tkáních myši. V případě plic tento rozdíl vytváří UCP2 mRNA, která byla v myších tkáních jednoznačně nejvyšší právě zde. Ostatní myši tkáně vykazovaly 10x až 100x nižší hodnotu transkripce UCP2 mRNA. Tyto výsledky indikují, že by UCP2 v myších plicích mohla

v průběhu evoluce získat nějakou specifickou úlohu, které však nebylo dosaženo v případě potkana. V mozku myši je naměřený rozdíl způsoben relativně vyšší transkripcí UCP4 a UCP5 mRNA. Ve svalu je za navýšení zodpovědná UCP3 mRNA. Je také možné, že v těchto tkáních se u myši vyvinula ochrana proti tvorbě kyslíkových radikálů (ROS) a ovlivnění energetického metabolismu. Myší organismus je totiž v porovnání s krysím mnohem menší a rychlost jeho metabolismu je rychlejší. Tato dvě kritéria by mohla vést k potřebě silnější ochrany výše uvedených tkání.

## 8.2. Kvantifikace UCP mRNA hladin po hladovění *ucp2* <sup>-/-</sup> myši

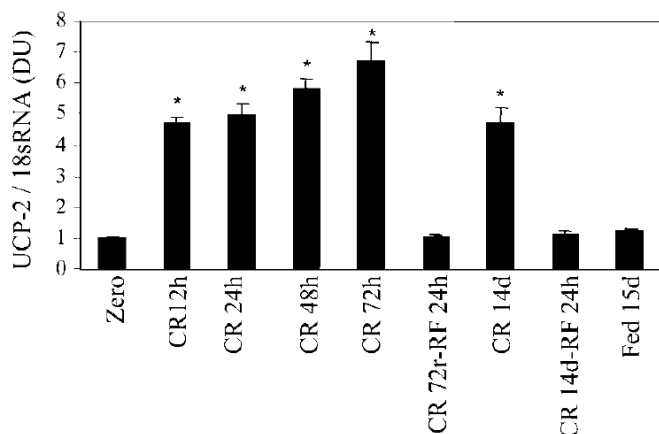
Omezení příjmu potravy je jedna z mála všeobecně uznávaných metod, která by měla prodlužovat délku života a je přijímána moderní i tradiční medicínou. U myši, které jsou hlavním modelem hladovění, bylo prokázáno, že 40% snížení množství podávané potravy zvyšuje maximální délku života až o 50% (*Weindruch a Sohal, 1997*). Navíc se předpokládá pozitivní vliv omezení příjmu potravy na oddálení chorob spojených se stárnutím jako jsou neurodegradativní choroby, nádorová onemocnění, kardiovaskulární onemocnění, autoimunitní choroby a diabetes.

Hlavním mechanismem pozitivního účinku hladovění je snižování produkce reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS). Mitochondriální ROS totiž napadají a ničí mtDNA a proteiny. Bylo prokázáno, že omezení potravy snižuje produkci ROS a oddaluje delece vznikající a kumulující v průběhu stárnutí (*Melov et al., 1997*). Mitochondriální ROS aktivují přes proteiny antioxidační ochrany expresi PGC-1 $\alpha$  a tak zvyšují mitochondriální biogenezi (*Ventura-Clapier et al., 2008*) a také transkripci UCP2. Navíc je exprese tohoto proteinu stimulována v průběhu hladovění nebo omezení příjmu potravy (*Bevilacqua et al., 2004; Minamiyama et al., 2007*). Tyto nálezy tak přispěly k hypotéze, že odpřahující proteiny jsou pojítkem mezi délkou života a sníženým příjmem potravy.

Zajímalo nás také, zda dochází k nějakým kompenzačním mechanismům pro odpřažení u *ucp2* knockoutové myši po hladovění. Zejména pro paralelní projekt využívající měření respirace mitochondrií izolovaných z *ucp2* <sup>-/-</sup> a kontrolních myši bylo důležité stanovit, zda není funkce UCP2 v plicích po hladovění nahrazena některým ze zbývajících odpřahujících proteinů.



Vliv sníženého příjmu potravy na UCP2 v plicích myši byl již popsán. Bylo zjištěno, že po snížení množství podávané potravy na 1/3 obvyklé spotřeby dochází již po dvanácti hodinách k pětinasobnému zvýšení množství UCP2 mRNA (po přepočtu na expresi 18S rRNA). Zvýšené množství UCP2 mRNA v tomto případě pozitivně koreluje s množstvím vzniklého proteinu (Xiao *et al.*, 2004). Časová závislost této diety na množství UCP2 mRNA je znázorněna v grafu 20.



Graf 20: Časová závislost transkripce UCP2 mRNA v plicích myši na době trvání snížení příjmu potravy (Převzato z Xiao *et al.*, 2004)

Naše výsledky potvrdily výše uvedená data pro plicní tkáň a navíc je rozšířily o hodnoty ze sleziny. Po jednodenním hladovění došlo u kontrolních myši v plicích k 1,6násobnému zvýšení a ve slezině k 31násobnému zvýšení množství UCP2 mRNA. Myši s deletovaným genem *ucp2* neměly detekovatelnou žádnou UCP2 mRNA.

Hlavním cílem tohoto projektu však bylo zjistit, zda dochází při hladovění k náhradě takto zvýšené transkripce UCP2 nějakou jinou izoformou odpráhujícího proteinu v *ucp2*<sup>-/-</sup> myši. Naše pozornost byla směřována především k UCP3. Bylo totiž publikováno, že hladovění způsobuje zvýšení UCP3 mRNA ve slezině, brzlíku (Carroll a Porter, 2004) a ve svalu (Gong *et al.*, 1997). Moje výsledky ale žádné zvýšení UCP3 mRNA u *ucp2*<sup>-/-</sup> ani u kontrolní myši po hladovění nenaznačují. Jako jediná byla po hladovění identifikována zvýšená hladina UCP4 mRNA v tkáni sleziny kontrolní myši. Toto zvýšení, ale není porovnatelné s hladinou UCP2 mRNA ve slezině hladověné myši a poměr mezi absolutními hodnotami mRNA hladin těchto dvou izoform je 55násobně vyšší u UCP2 mRNA. V plicích hladovějících zvířat bylo vždy sledováno snížení množství UCP4 a UCP5 mRNA. Na úrovni transkripce mRNA nebyl tedy v žádné ze zvolených tkání pozorován prokazatelný kompenzační efekt, který by nahrazoval zvýšenou transkripci UCP2 v hladověných myších s deletovaným *ucp2* genem.

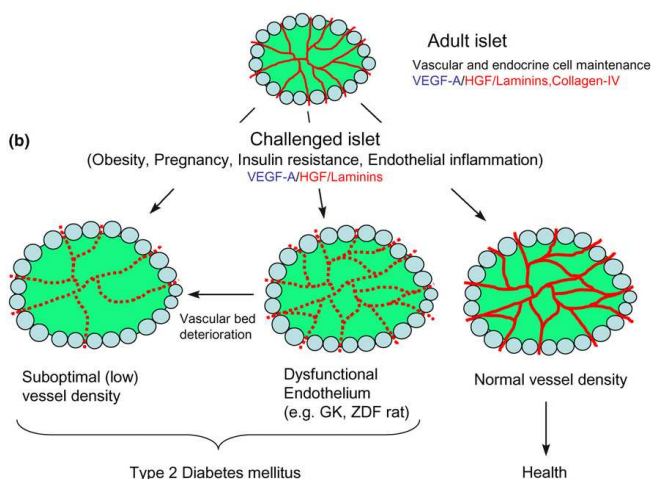
Pokračováním tohoto projektu bude hledání mitochondriálního membránového proteinu, jehož exprese bude závislá na transkripčních faktorech regulovaných hladověním jako u UCP2.

### 8.3. Vliv parciálního tlaku kyslíku na transkripci *ucp2* v pankreatických beta buňkách

Diabetes mellitus (cukrovka) se stává díky vzrůstající obezitě a sedavému způsobu života jedním z nejrozšířenějších onemocnění. Podle Diabetické asociace České republiky (ČR) byla v ČR již překonána hranice jednoho milionu obyvatel postižených touto nemocí. V dnešní době je hlavní strategií pro léčbu diabetu druhého typu snaha najít mechanismy, kterými by bylo možno snížit inzulinovou rezistenci nebo zvýšit sekreci inzulinu. Důležitým modelem, na kterém lze sledovat změny v sekreci inzulinu v závislosti na různých kultivačních podmínkách jsou inzulinomové INS-1E buňky.

INS-1E buňky byly vyselektovány z INS-1 potkaní tkáňové linie na Ženevské univerzitě (*Maechler et al., 1997*). Tyto buňky obsahují mnoho inzulinových granul a jsou schopny sekretovat inzulin po stimulaci glukózou (GSIS) i v průběhu mnoha pasáží. Staly se tak všeobecně uznávaným modelem pankreatických beta buněk (*Merglen et al., 2004*). Objev exprese UCP2 v beta buňkách a jeho následné studie odhalily, že je UCP2 negativním regulátorem GSIS (*Chan a Kashemsant, 2006*).

Množství UCP2 je v pankreatických beta buňkách regulováno na úrovni transkripční i translační. Transkripce UCP2 mRNA je stimulována hyperglykemií, hyperlipidemií, chladovou expozicí a hladověním přes příslušné transkripční faktory (viz kapitola 5.4.2.1). Represe transkripce UCP2 mRNA je zajišťována sirtuiny (*Bordone et al., 2006*) a interleukinem IL-1-beta (*Li et al., 2003*). Na úrovni translace proteinu může být exprese UCP2 inhibována díky existenci druhého čtecího rámce, umístěného na UCP2 mRNA před vlastním iniciačním kodonem (*Hurtaud et al., 2006*). Tato regulace je závislá na přítomnosti glutaminu (*Hurtaud et al., 2007*). Pozitivní funkční regulace probíhá v závislosti na ROS (*Echtay et al., 2002*), inhibice naopak purinovými nukleoziddifosfáty a trifosfáty (*Zackova et al., 2003*). Nikdy však nebyla popsána regulace UCP2 množstvím kyslíku v kultivační atmosféře. Chybí také informace o množství kyslíku, které je dodáváno beta buňkám nebo do Langerhansova ostrůvku. Předpokládaná distribuce cév v ostrůvku je znázorněna na obrázku 14. K dispozici jsou informace z měření provedených na pacientech s diagnostikovaným adenokarcinomem pankreatu. U těchto pacientů byl měřen parciální tlak kyslíku ve zdravé tkáni a v tumoru slinivky. V tumorech byl naměřen parciální tlak kyslíku v rozmezí 0 – 5 mm Hg, což odpovídá maximálně jednomu procentu celkového parciálního tlaku. V nepostižené tkáni slinivky hodnoty parciálního tlaku kolísaly mezi 24 a 92 mm Hg, což odpovídá 3% až 12% parciálního tlaku kyslíku (*Koong et al., 2000*).



obrázek 14: Patologické a optimální rozložení cév skrz Langerhansův ostrůvek (Převzato z Eberhard et al., 2010)

Na základě těchto informací jsme zkoušeli viabilitu INS-1E v závislosti na množství kyslíku v kultivační atmosféře. Byla vybrána hodnota 5%, která se nejvíce blíží fyziologické hodnotě koncentrace kyslíku v Langerhansově ostrůvku a následně byla použita při dalších měřeních.

Jako první jsme objevili negativní regulaci exprese UCP2 v INS-1E buňkách závislou na množství kyslíku, přítomného v kultivační atmosféře. Při simulaci předpokládaných fyziologických hodnot dochází třetí den k čtyřnásobnému poklesu exprese UCP2 mRNA. To by naznačovalo, že bioenergetické pokusy a pokusy zkoumající GSIS na beta buňkách a inzulinomových buňkách tkáňových kultur pěstovaných za atmosferického tlaku kyslíku přisuzují UCP2 mnohem větší podíl na regulaci GSIS a diabetu druhého typu než jaký ve skutečnosti má. Tím by se potvrdila hypotéza stanovená na *ucp2* knockoutových myších, že UCP2 by měla spíše regulovat hladinu ROS než regulovat GSIS (Echtay et al., 2002). Myši s deletovaným *ucp2* genem měli vysokou hladinu ROS, ale GSIS zůstala stejná jako u kontrolních myší. Navíc pankreatické beta buňky jsou díky nižší expresi antioxidantních enzymů velice senzitivní vůči oxidativnímu stresu (Lenzen et al., 1996). Všechny tyto výsledky tak směřují k hypotéze, že hlavní funkcí UCP2 v beta buňkách je regulace tvorby ROS.

Dále budeme hledat, zda je při 5% kyslíku množství UCP2 sníženo i na proteinové úrovni pomocí western blotů, zda dochází k nějakým rozdílům v GSIS a zda a za jak dlouho dojde ke zvýšení UCP2 mRNA při obrácení trendu. Tedy u přechodu z kultivace při nízkém tlaku kyslíku do kultivace při atmosferickém tlaku kyslíku. Tímto měřením bychom simulovali situaci při izolaci Langerhansových ostrůvků, které jsou často zpracovávány až několik dní po izolaci.

## 9. Závěr

Absolutní hladiny transkriptů mitochondriálních odpřahujících proteinů UCP2, UCP3, UCP4 a UCP5 vykazují mezi potkaními a myšími tkáněmi odlišný transkripční profil. Největší rozdíly mezi těmito dvěma organizmy byly naměřeny u tkání plic, mozku a svalu. Ve všech těchto tkáních byly nalezeny vyšší hladiny v tkáních myši. V plicích tento rozdíl vytváří UCP2 mRNA, v mozku to jsou izoformy UCP4 a UCP5 mRNA a konečně ve svalu je to UCP3 mRNA.

Žádná ze zkoumaných izoform nenahrazuje v plicích ani ve slezině transkripci UCP2 mRNA u *ucp2* knockoutové myši, a to ani po stimulaci hladověním.

Byla objevena nová regulace transkripce UCP2 mRNA v potkaních inzulinomových beta buňkách. Tato regulace je závislá na parciálním tlaku kyslíku v kultivační atmosféře. Během kultivace buněk INS-1E za nízkého parciálního tlaku kyslíku (5% O<sub>2</sub>) dochází ke čtyřnásobnému snížení transkripce UCP2 mRNA v porovnání s buňkami kultivovanými za normálního atmosferického tlaku.

## 10. Seznam literatury

- Adams, A. E., Hanrahan, O., Nolan, D. N., Voorheis, H. P., Fallon, P. & Porter, R. K. (2008). Images of mitochondrial UCP 1 in mouse thymocytes using confocal microscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 115-117.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B. S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M. C., Goubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S. & Ricquier, D. (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.
- Azzu, V. & Brand, M. D. (2010). Degradation of an intramitochondrial protein by the cytosolic proteasome. *J Cell Sci*, 123, 578-585.
- Benard, G. & Karbowski, M. (2009). Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin Cell Dev Biol*, 20, 365-374.
- Bevilacqua, L., Ramsey, J. J., Hagopian, K., Weindruch, R. & Harper, M. E. (2004). Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, E852-861.
- Bezaire, V., Hofmann, W., Kramer, J. K., Kozak, L. P. & Harper, M. E. (2001). Effects of fasting on muscle mitochondrial energetics and fatty acid metabolism in Ucp3(-/-) and wild-type mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281, E975-982.
- Bezaire, V., Seifert, E. L. & Harper, M. E. (2007). Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J*, 21, 312-324.
- Bordone, L., Motta, M. C., Picard, F., Robinson, A., Jhala, U. S., Apfeld, J., McDonagh, T., Lemieux, M., McBurney, M., Szilvasi, A., Easlson, E. J., Lin, S. J. & Guarente, L. (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol*, 4, e31.
- Borecky, J., Maia, I. G. & Arruda, P. (2001). Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants. *Biosci Rep*, 21, 201-212.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. & Giacobino, J. P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett*, 408, 39-42.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169-193.
- Cannon, B. & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84, 277-359.
- Carroll, A. M. & Porter, R. K. (2004). Starvation-sensitive UCP 3 protein expression in thymus and spleen mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1700, 145-150.
- Cortez-Pinto, H., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Costa, S., Hwang, C. S., Lane, M. D., Bagby, G. & Diehl, A. M. (1998). Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 313-319.
- Costford, S. R., Chaudhry, S. N., Salkhordeh, M. & Harper, M. E. (2006). Effects of the presence, absence, and overexpression of uncoupling protein-3 on adiposity and fuel metabolism in congenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290, E1304-1312.
- Dhillon, H., Kalra, S. P., Prima, V., Zolotukhin, S., Scarpace, P. J., Moldawer, L. L., Muzyczka, N. & Kalra, P. S. (2001). Central leptin gene therapy suppresses body weight gain, adiposity and serum insulin without affecting food consumption in normal rats: a long-term study. *Regul Pept*, 99, 69-77.
- Eberhard, D., Kragl, M. & Lammert, E. (2010). 'Giving and taking': endothelial and beta-cells in the islets of Langerhans. *Trends Endocrinol Metab*.
- Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J. C. & Brand, M. D. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, 415, 96-99.

- Enerback, S., Jacobsson, A., Simpson, E. M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M. E. & Kozak, L. P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, *387*, 90-94.
- Faggioni, R., Shigenaga, J., Moser, A., Feingold, K. R. & Grunfeld, C. (1998). Induction of UCP2 gene expression by LPS: a potential mechanism for increased thermogenesis during infection. *Biochem Biophys Res Commun*, *244*, 75-78.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D. & Warden, C. H. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*, *15*, 269-272.
- Fleury, C. & Sanchis, D. (1999). The mitochondrial uncoupling protein-2: current status. *Int J Biochem Cell Biol*, *31*, 1261-1278.
- Gimeno, R. E., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Shyjan, A. W., Gimeno, C. J., Iris, F., Ellis, S. J., Woolf, E. A. & Tartaglia, L. A. (1997). Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes*, *46*, 900-906.
- Gong, D. W., He, Y., Karas, M. & Reitman, M. (1997). Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem*, *272*, 24129-24132.
- Hackenbrock, C. R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol*, *30*, 269-297.
- Himms-Hagen, J. & Harper, M. E. (2001). Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med (Maywood)*, *226*, 78-84.
- Hurtaud, C., Gelly, C., Bouillaud, F. & Levi-Meyrueis, C. (2006). Translation control of UCP2 synthesis by the upstream open reading frame. *Cell Mol Life Sci*, *63*, 1780-1789.
- Hurtaud, C., Gelly, C., Chen, Z., Levi-Meyrueis, C. & Bouillaud, F. (2007). Glutamine stimulates translation of uncoupling protein 2mRNA. *Cell Mol Life Sci*, *64*, 1853-1860.
- Chan, C. B., De Leo, D., Joseph, J. W., McQuaid, T. S., Ha, X. F., Xu, F., Tsushima, R. G., Pennefather, P. S., Salapatek, A. M. & Wheeler, M. B. (2001). Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes*, *50*, 1302-1310.
- Chan, C. B. & Kashemsant, N. (2006). Regulation of insulin secretion by uncoupling protein. *Biochem Soc Trans*, *34*, 802-805.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E. A., Weng, X., Ellis, S. J., Lakey, N. D., Culpepper, J., Moore, K. J., Breitbart, R. E., Duyk, G. M., Tepper, R. I. & Morgenstern, J. P. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, *84*, 491-495.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, *162*, 156-159.
- Jaburek, M., Miyamoto, S., Di Mascio, P., Garlid, K. D. & Jezek, P. (2004). Hydroperoxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2. *J Biol Chem*, *279*, 53097-53102.
- Jezek, P. (2002). Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins--UCPn. *Int J Biochem Cell Biol*, *34*, 1190-1206.
- Jezek, P. & Borecky, J. (1998). Mitochondrial uncoupling protein may participate in futile cycling of pyruvate and other monocarboxylates. *Am J Physiol*, *275*, C496-504.
- Jezek, P. & Hlavata, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol*, *37*, 2478-2503.
- Jezek, P., Jaburek, M. & Garlid, K. D. (2010a). Channel character of uncoupling protein-mediated transport. *FEBS Lett*.
- Jezek, P., Plecita-Hlavata, L., Smolkova, K. & Rossignol, R. (2010b). Distinctions and similarities of cell bioenergetics and the role of mitochondria in hypoxia, cancer, and embryonic development. *Int J Biochem Cell Biol*, *42*, 604-622.
- Kizaki, T., Suzuki, K., Hitomi, Y., Taniguchi, N., Saitoh, D., Watanabe, K., Onoe, K., Day, N. K., Good, R. A. & Ohno, H. (2002). Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide

- production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 9392-9397.
- Klingenberg, M. (1999). Uncoupling protein--a useful energy dissipator. *J Bioenerg Biomembr*, 31, 419-430.
- Klingenspor, M. (2003). Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol*, 88, 141-148.
- Koong, A. C., Mehta, V. K., Le, Q. T., Fisher, G. A., Terris, D. J., Brown, J. M., Bastidas, A. J. & Vierra, M. (2000). Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 48, 919-922.
- Krauss, S., Zhang, C. Y. & Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 248-261.
- Lanni, A., De Felice, M., Lombardi, A., Moreno, M., Fleury, C., Ricquier, D. & Goglia, F. (1997). Induction of UCP2 mRNA by thyroid hormones in rat heart. *FEBS Lett*, 418, 171-174.
- Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A. & Goglia, F. (2003). Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett*, 543, 5-10.
- Lengacher, S., Magistretti, P. J. & Pellerin, L. (2004). Quantitative rt-PCR analysis of uncoupling protein isoforms in mouse brain cortex: methodological optimization and comparison of expression with brown adipose tissue and skeletal muscle. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24, 780-788.
- Lenzen, S., Drinkgern, J. & Tiedge, M. (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*, 20, 463-466.
- Li, L. X., Yoshikawa, H., Egeberg, K. W. & Grill, V. (2003). Interleukin-1beta swiftly down-regulates UCP-2 mRNA in beta-cells by mechanisms not directly coupled to toxicity. *Cytokine*, 23, 101-107.
- Lowell, B. B., V, S. S., Hamann, A., Lawitts, J. A., Himms-Hagen, J., Boyer, B. B., Kozak, L. P. & Flier, J. S. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*, 366, 740-742.
- Maechler, P., Kennedy, E. D., Pozzan, T. & Wollheim, C. B. (1997). Mitochondrial activation directly triggers the exocytosis of insulin in permeabilized pancreatic beta-cells. *EMBO J*, 16, 3833-3841.
- Mao, W., Yu, X. X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H. & Pan, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett*, 443, 326-330.
- Mattiasson, G. & Sullivan, P. G. (2006). The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1-38.
- Medvedev, A. V., Snedden, S. K., Raimbault, S., Ricquier, D. & Collins, S. (2001). Transcriptional regulation of the mouse uncoupling protein-2 gene. Double E-box motif is required for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent activation. *J Biol Chem*, 276, 10817-10823.
- Melov, S., Hinerfeld, D., Esposito, L. & Wallace, D. C. (1997). Multi-organ characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial DNA rearrangements with age. *Nucleic Acids Res*, 25, 974-982.
- Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. B. & Maechler, P. (2004). Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology*, 145, 667-678.
- Minamiyama, Y., Takemura, S., Tsukioka, T., Shinkawa, H., Kobayashi, F., Nishikawa, Y., Kodai, S., Mizuguchi, S., Suehiro, S. & Okada, S. (2007). Effect of AOB, a fermented-grain food supplement, on oxidative stress in type 2 diabetic rats. *Biofactors*, 30, 91-104.
- Mori, S., Yoshizuka, N., Takizawa, M., Takema, Y., Murase, T., Tokimitsu, I. & Saito, M. (2008). Expression of Uncoupling Proteins in Human Skin and Skin-Derived Cells. *J Invest Dermatol*.
- Mozo, J., Ferry, G., Studeny, A., Pecqueur, C., Rodriguez, M., Boutin, J. A. & Bouillaud, F. (2006). Expression of UCP3 in CHO cells does not cause uncoupling, but controls mitochondrial activity in the presence of glucose. *Biochem J*, 393, 431-439.
- Nicholls, D. G. (2002). Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 34, 1372-1381.

- Nogueira, F. T., Borecky, J., Vercesi, A. E. & Arruda, P. (2005). Genomic structure and regulation of mitochondrial uncoupling protein genes in mammals and plants. *Biosci Rep*, 25, 209-226.
- Pecqueur, C., Alves-Guerra, M. C., Gelly, C., Levi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F. & Miroux, B. (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem*, 276, 8705-8712.
- Plecita-Hlavata, L., Lessard, M., Santorova, J., Bewersdorf, J. & Jezek, P. (2008). Mitochondrial oxidative phosphorylation and energetic status are reflected by morphology of mitochondrial network in INS-1E and HEP-G2 cells viewed by 4Pi microscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 834-846.
- Ricquier, D. & Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J*, 345 Pt 2, 161-179.
- Rim, J. S. & Kozak, L. P. (2002). Regulatory motifs for CREB-binding protein and Nfe2l2 transcription factors in the upstream enhancer of the mitochondrial uncoupling protein 1 gene. *J Biol Chem*, 277, 34589-34600.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Gubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Gregoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Miroux, B., Collins, S., Seldin, M., Richard, D., Warden, C., Bouillaud, F. & Ricquier, D. (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.
- Schleiff, E. & McBride, H. (2000). The central matrix loop drives import of uncoupling protein 1 into mitochondria. *J Cell Sci*, 113 ( Pt 12), 2267-2272.
- Skulachev, V. P. (1991). Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*, 294, 158-162.
- Skulachev, V. P. (1996). Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett*, 397, 7-10.
- Smorodchenko, A., Rupprecht, A., Sarilova, I., Ninnemann, O., Brauer, A. U., Franke, K., Schumacher, S., Tchriz, S., Nitsch, R., Schuelke, M. & Pohl, E. E. (2009). Comparative analysis of uncoupling protein 4 distribution in various tissues under physiological conditions and during development. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 2309-2319.
- Thonberg, H., Fredriksson, J. M., Nedergaard, J. & Cannon, B. (2002). A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *Biochem J*, 364, 73-79.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res*, 79, 208-217.
- Weindruch, R. & Sohal, R. S. (1997). Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N Engl J Med*, 337, 986-994.
- Xiao, H., Massaro, D., Massaro, G. D. & Clerch, L. B. (2004). Expression of lung uncoupling protein-2 mRNA is modulated developmentally and by caloric intake. *Exp Biol Med (Maywood)*, 229, 479-485.
- Yamada, M., Hashida, T., Shibusawa, N., Iwasaki, T., Murakami, M., Monden, T., Satoh, T. & Mori, M. (1998). Genomic organization and promoter function of the mouse uncoupling protein 2 (UCP2) gene. *FEBS Lett*, 432, 65-69.
- Yoshitomi, H., Yamazaki, K. & Tanaka, I. (1998). Cloning of mouse uncoupling protein 3 cDNA and 5'-flanking region, and its genetic map. *Gene*, 215, 77-84.
- Young, J. B., Saville, E., Rothwell, N. J., Stock, M. J. & Landsberg, L. (1982). Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue of the rat. *J Clin Invest*, 69, 1061-1071.
- Yu, X. X., Mao, W., Zhong, A., Schow, P., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H. & Pan, G. (2000). Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *FASEB J*, 14, 1611-1618.
- Zackova, M., Skobisova, E., Urbankova, E. & Jezek, P. (2003). Activating omega-6 polyunsaturated fatty acids and inhibitory purine nucleotides are high affinity ligands for novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J Biol Chem*, 278, 20761-20769.



- Zhang, C. M., Gu, Y., Qing, D. N., Zhu, J. G., Zhu, C., Zhang, M. & Guo, X. R. (2009). Tissue-specific distribution of uncoupling proteins in normal rats and rats with high-fat-diet-induced obesity. *Mol Biol Rep*.
- Zhang, C. Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A. J., Boss, O., Kim, Y. B., Zheng, X. X., Wheeler, M. B., Shulman, G. I., Chan, C. B. & Lowell, B. B. (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*, 105, 745-755.

## Příloha 1

Porovnaní mRNA sekvencí pro UCP2, UCP3, UCP4 a UCP5 mRNA laboratorního potkana. Zobrazena je pouze část, ve které se primery nacházejí (šedou barvou jsou vyznačena místa nasedání dvojic primerů pro jednotlivé ucp geny).

UCP2	ATCGCTTGCTTCTTGGGCAGCCACCGCCCGTCGGACCTAGCCGTCTGCACTCCTGTGT	60
UCP3	-----	
UCP5	-----	
UCP4	-----	
UCP2	TCTCCTGTGTATTCTCCTGCGGTCCGGACACAATAGTATGATCTTTAAGTGTTTCGTCTC	120
UCP3	-----	
UCP5	-----GAGTCGTCTGCTGAGCTTGAGCAGCTGAGTCCCTTCCCTGTCTTTCACTCT	51
UCP4	-----	
UCP2	CCAGACATTTTCTATGGGAAATCAAGGGGATCAGGCCATGATAGCCACTGGCAGCTTTGA	180
UCP3	-----	
UCP5	TCTGGCATCGGTGGCTTTACTTCTTC--GATTGAGCTCTGCT--TCCTCGACCCCCCGG	107
UCP4	-----	
UCP2	AGAACGGGACACCTTTAGAGAAGCTTGATCTTGAGGCCTCAGCGTGAGACCTCAAAGCA	240
UCP3	-----CAGTGAATGGTGAGGAGGGG	20
UCP5	GAGGCCGCTCCTTACGGCGCTCCCTTCTCTCTACGAACTCGCTCTGACAGCCGAGGAA	167
UCP4	-----	
UCP2	CCCTCCGACTCCGGC-----AGAGTTCCTCTGTCTCGT-CTTGACGATTGAAGGTCCCC	294
UCP3	CTGTCA-GATCCTGCT-----GCTGCTAATGGATGGAGC-CTTAGGGTCCCCCTACACCT	73
UCP5	CTGGCAAGATCCTGTACCCAGAGGGTGAATGGGTATCTTTCTGGAATAATCCTAATTTT	227
UCP4	-----GCACGAGGCCAGGCGA	17
UCP2	ACT--GCTTCAGTTTTTCTCCATCTTCTG-GGAGGTAGCAGGAAGTC---AGAATCATG	347
UCP3	CCT--GACCTTGGCTAGACTCACAGGCAGCAAAGGAACAGGCCATCCTCCGGAACCATG	131
UCP5	TCTAAGGGTGAAGTTTGCACCGCAGCAGT <span style="background-color: #d3d3d3;">GATTGTAAGCGGACATC</span> ---AGAA--AAG	281
UCP4	CTAGCGGTGCCACTGGTCTG--ACCTGCTGCTGAAT--GCCTTTCCTGAGGAGGAGT	73
	* * * * *	
UCP2	GTTGGTTTCAAGGCCACCGATGTGCCCCCCACAGCCACCGTGAAGTTCCTGGGGGC--TG	405
UCP3	GTTGGACTTCAGCCATCAGAAAGTGCCTCCCACAACAGTTGTAAGTTCCTGGGGGC--CG	189
UCP5	TTCCGCTTTAAGCCATGAGATGTCTGGTCTG---AACTGGAACCTTTGTGTATGGCG	337
UCP4	CGCTACAGCCACTCACGCAGAGATGGCCCCG---GACCAGCAAGTTCCTACTGTC--CG	127
	* * * * *	
UCP2	GGACAGCAGCCTGTATTGCAGATCTCATCACTTCCCTCTAGACACCGCCAAAGTCCGGC	465
UCP3	GCACTGCAGCCTGTTTTGCTGATCTCCTCACCTTCCCCTGGACACCGCCAAAGTCCGGC	249
UCP5	GCCTTGCTCTATTGTTGCCGAGTTCGGCACTTCCCTGTGGATCTTACTAAAAACCGGC	397
UCP4	GCTGCGCCGCAACCGTGGCCGAGCTAGCAACCTTCCCTCGATCTCACAAAAACCGAC	187
	* ** * * * * *	
UCP2	TGCAGATCCAAGGAGAGAGTCAAGGGCTAGCGCGCACCGCCGCCAGCGCCAGT-----	519
UCP3	TGCAGATCCAAGGGGAGAACCCAGGA-----GTGCAG-----AGCGTGCAGT-----	291
UCP5	TGCAAGTCCAAGGTCAGAGTATCGATGTCCGTTTCAA-----GAAATAAAT-----	445
UCP4	TCCAGATGCAAGGAGAAAGCTGCCCTTGCTAAGTTGGGAGATGGTGCGATGGAATCCGCCC	247
	* * * * * * * *	
UCP2	---ACCGCGCGTGCTGGGCACC--ATCCTAACCATGGTGCGCACTGAGGGTCCCGCGCAG	574
UCP3	---ACCGCGCGTGCTCGGTACC--ATCCTGACTATGGTGCGCACAGAGGGTCCCGCGCAG	346
UCP5	---ATAGAGGGATGTTTACGCTTGTTCGGAATCTATAGAGAAGAAGGCATCTTGGC--	500
UCP4	CTTACAGGGGCATGATGCGCACG--GCCCTGGGATTGTCCAGGAGGAAGGCTTCCCTAAA	305
	* * * * * * *	

UCP2 | CCTCTACAATGGGCTGGTCGCCGGCCTACAGCGCCAGATGAGCTTTGCCCTCCGTCGGCAT 634  
UCP3 | CCCCTACAGCGGGCTGGTCGGCTGGCCTGCATCGCCAGATGAGTTTTGCCCTCCATTCGAAT 406  
UCP5 | CCTGTATTCGGGAATTGCCCTGCTTTACTAAGACAGGCATCATATGGCACCATCAAAAT 560  
UCP4 | GTTGTGGCAAGGAGTGACGCCCGCCATTACAGACACGTAGTGTACTCTGGAGGTCGGAT 365  
\* \* \* \* \*

UCP2 | TGGCCTCTACGACTCTGTA-AAGCAGTTCTACACC---AAGGGCTCAGAGCATGCAGGCA 690  
UCP3 | TGGCCTCTACGACTCTGTC-AAGCAGTTCTACACCCCAAGGAACGGACCACTCCAGCG 465  
UCP5 | TGGTATTTATCAAAGCTTG-AAGCGATTATTTGTA---GAACGTTTGGAAGATGAGACTC 616  
UCP4 | GGTCACCTACGAACATCTCCGGGAAGTTGTGTTTGGCAAAAGTGAAGATGAACATTATCC 425  
\* \* \* \* \*

UCP2 | TTGGGAGCCGCCT--CCTGGCAGGTAGCACACAGGTGCCCTGGCTGTGGCTGTGGCCCA 748  
UCP3 | TCGCCATCAGGAT--TCTGGCAGGCTGCACACGGGAGCCATGGCAGTGACCTGTGCTCA 523  
UCP5 | TCCTAATTAATATGATCTGTGGAGTAGTGTCA--GGAGTGATTTTCATCTACTATTGCCAA 674  
UCP4 | CCTCTGGAAGTCCGTCATTGGAGGGATGATGGCTGGCCTCATCGGACAGTTTTTTAGCCAA 485  
\* \* \* \* \*

UCP2 | ACCTACAGATGTGGTAAAGGTCCGCTTCCAGGCC----CAGGCCCGGG--CTGGCGGTGG 802  
UCP3 | ACCCAAGGATGTGGTGAAGGTCCGATTTCAAGCCATGATACGCCTGGGAAGTGGAGGCCA 583  
UCP5 | CCCCACGTATGTTCTAAAGATTCCGAATGCAGGCT-----CAAGGAAGCTTGTTCCAA 726  
UCP4 | CCCCACGTACCTCGTGAAGGTCCAGATGCAAAATGG-AAGGGAACCGTAGACTGGAAGGGA 544  
\* \* \* \* \*

UCP2 | TCG---GAGATACCAGAGCACTGTGCAAGCCTACAAGACCATTGCACGAGGAAGGGA 858  
UCP3 | GAG---GAAATACAGAGGGACTATGGATGCCTACAGAACCATCGCCAGGAAGAAGGAG 639  
UCP5 | G-----GGAGCATGATTGGCAGCTTCATAGATATATACCAGCAGGAAGGCA 772  
UCP4 | AACCCTTGAGATTCCGTTGGAGTACATCATGCGTTTGCAAAAATCTTAGCTGAAGGAGAA 604  
\* \* \* \* \*

UCP2 | TCCGGGGCCTCTGGAAAGGACCTCTCCAATGTTGCCCGAAATGCCATTGTCAACTGTA 918  
UCP3 | TCAGGGGACTGTGGAAAGGACTTGGCCCAACATCACAAGAAACGCCATTGTCAATTGTG 699  
UCP5 | CCAGGGGTCTGTGGAGAGGTGTGGTCCCAACTGCTCAGCGTGTGCCATCGTGTGGGAG 832  
UCP4 | TCCGTGGGCTTTGGGCAAGGCTGGATACCCAATATTCAGAGAGCAGCACTTGTGAACATGG 664  
\* \* \* \* \*

UCP2 | CTGAGCTGGTGACCTATGACCTCATCAAAGATACTCTCCTGAAAGCCAACTCATGACAG 978  
UCP3 | CTGAGATGGTGACCTATGACATCATCAAGGAGAAGCTGCTGGACTCTCACCTGTTCACTG 759  
UCP5 | TAGAGTTGCCAGTTTATGATATTACCAAGAAGCACCTGATAGTTTTCGGGAATGCTGGGAG 892  
UCP4 | GAGATTTAACCACCTTACGACACAGTGAAGCACTACCTGGTATTGAACACAGCACTTGAAG 724  
\* \* \* \* \*

UCP2 | ACGACCTCCCTTGCCACTTCACTTCTGCCTTCGGGGCGGGCTTCTGCACCAACCGTCATTG 1038  
UCP3 | ACAACTTCCCCTGTCACTTGTCTCTGCCTTTGGAGCTGGTTTCTGTGCCACGGTGGTGG 819  
UCP5 | ACACAAATTTAACACACTTTGTTTCCAGCTTTACCTGTGGTTTGGCTGGGGCTCTGGCAT 952  
UCP4 | ACAATACTGCCACTCAGCGCTTATCCAGTTTGTGTTCTGGACTGGTGGCTTCTATTCTGG 784  
\* \* \* \* \*

UCP2 | CCTCCCCGTTGATGTGGTCAAGACGAGATATATGAAC-----TCTGCC 1082  
UCP3 | CCTCCCCAGTGGATGTGGTAAAGACCCGATACATGAAC-----GCTCCC 863  
UCP5 | CTAACCCTGTGGATGTGGTGAAGACTCGAATGATGAATCAGAGG-GCAATAGTGGGACAT 1011  
UCP4 | GAACACCAGCCGATGTCAATCAAAGCCGAATAATGAACCAACCTCGAGACAAACAAGGAA 844  
\* \* \* \* \*

UCP2 | TTGGGCCAGTACCACAGCGCCGGCC--ACTGTGCCCTGACCATGCTCCGGAAGGAGGGGC 1140  
UCP3 | CCAGGCAGGTACCGAAGCCCCCTAC--ACTGTATGCTGAGGATGGTGGCCAGGAGGGCC 921  
UCP5 | GTGGACCTCTACAAGGGTACTTTGG--ATGGTATTTTAAAGATGTGGAACATGAGGGAT 1069  
UCP4 | GAGGGCTTTTGTATAAGTCACTCACTGACTGCGTATCCAGGCTGTTCAAGGAGAAGGCT 904  
\* \* \* \* \*

UCP2 | CCCGAACTTCTACAAGGGGTTTCAAGCCTTCTCCTCCGCTTGGGATCCTGGAACGTAG 1200  
UCP3 | CCACAGCCTTCTACAAGGATTTCATGCCTCCTTTCTGCGTCTGGGATCCTGGAACGTGA 981  
UCP5 | TTTTTCACCTCTATAAAGGATTTTGGCCAAACTGGCTTCGACTTGGACCTTGGAAACATCA 1129  
UCP4 | TCCTGAGCCTGTATAAAGGCTTTCTACCCTCCTGGCTGAGAATGACCCCTTGGTCAATGG 964  
\* \* \* \* \*

```

UCP2 | TAATGTTTGTACCTATGAG-----CAGCTCAAAAGGGCC---CTGATGGCTGCCT 1248
UCP3 | TGATGTTTGTAACTACGAG-----CAGCTGAAACGGGCC---TTGATGAAAGTCC 1029
UCP5 | TTTTTTTTATTACGTATGAG-----CAGCTCAAGAGGGCTT---CAGATCTAAGAAC 1177
UCP4 | TGTTCTGGCTTACTTATGAAAAATCAGACAGCTGAGTGGAGTCAGTCCATTCTAAGCCC 1024
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

## Příloha 2

Porovnaní mRNA sekvencí pro UCP2, UCP3, UCP4 a UCP5 mRNA laboratorní myši. Zobrazena je pouze část, ve které se primery nacházejí (šedou barvou jsou vyznačeny místa nasedání dvojic primerů pro jednotlivé ucp geny).

```

UCP2 | GAGTTCGCGCCCTCGGTGTCGTCGGGTCGCCAGCTTCCTGGGCAGCCACCACTCTCCCGCC 60
UCP3 | -----
UCP5 | -----
UCP4 | GGACTTGCTGCTGAATGCCTATCGCCGAGGAGGAGAAGCTGCTGCCGCTACGCAGAGAT 60

UCP2 | GTCGGACACAGCCTTCTGCACTCCTGTGTTCTCCTGCGGTCCGGACACAATAGTATGAAC 120
UCP3 | -----
UCP5 | -----
UCP4 | GGCCCCGGACGAGCAAATTCTACTGTCGCCGTGCGCCGCAACCGTGGCCAGCTAGCAA 120

UCP2 | TTTAAGTGTTCGTCTCCCAGCCATTTTCTATGGAATAATCGAGGGGATCGGGCCATGGTA 180
UCP3 | -----AGACAACAGTGAAT-GGTGAGGCCCGCCGCTCAGA 34
UCP5 | -----GGCGGTGGCTAGCTGCCGAC 21
UCP4 | CCTTTCCCTCGATCTCACAAAAACCCGACTCCAGATGC AAGGAGAAGCTGCCCTTGCTA 180
                                           * *

UCP2 | GCCACCG--GCAGCTTTGAAGAACGAGACACCTTTAGAGAAGCTTGACCTTGGAGGCCCTC 238
UCP3 | TCCTGCT--GCTACCTAATGGAGTGGAGC--CTTAGGGTGGCCCTGCACTACCCAACCTT 90
UCP5 | CTTTTTGC-ACAGGATCTGACTCTGGCCTTTTGAAATTTAATGTTTCTTTTCAATTCGC 80
UCP4 | GGTGGGAGATGGCGCAGTGGACTCTGCCCTTATAGGGGCATGGTGGCAGCGCCCTGG 240
                               ** * *

UCP2 | AGCCTGAGACCTCAAAGCA--GCCTCCA-GAACTCCGGCAGAGTTCCTCTGTCTCGTCTT 295
UCP3 | GGCTAGA---CGCACAGCT--TCCTCCCTGAACTGAAGCAAAAAGA-----TT 132
UCP5 | GCCTTGCTTTTCCAGGCTAGGAGTGGCGGAGTTTAGGATGGCTGCGCCAC----TGT 136
UCP4 | GAATTG----TTCAGGAGGAAGGCTTCCTAAAGCTGTGGCAAGGAGTGACGC-----CC 290
      * * * * * *

UCP2 | GCCGATG AAGGTCCCCTTTCTCCAA TTTCTCTCCATCTTCTGGGAGGTAG--CAGGAA 353
UCP3 | GCCAGGCAAG----CTCTCTCCTCGGACCTCCATAGGCAGCAAAGGAACAGGCCCATTC 188
UCP5 | GCCGAGGCGA-----CGCCTTGGTTACTTCCGTGGTTTCAATGCTTCCGG----- 182
UCP4 | GCCATTTACAGA---CACGTAGTGTAC-TCTGGAGGTGGATGGTCACTA---TGAAC 342
*** * * * * *

UCP2 | ATCAGAA TCATGGTTGGTTTCAAGGCCACAGATG-TGCCCCCAACAGCCACTGTGAA--G 410
UCP3 | CCCGGGACCATGGTTGGA CTTCAGCCCTCCGAAG-TGCCCTCCCAACCGTTGTGAA--G 245
UCP5 | GTTGGCGCTGCGGTGGCGTTTC---CTACTGTGG-TAGCCTCCGCTTCC-CAGTCG---- 233
UCP4 | ATCTACGG-GAAGTCGTGTTTGGCAAAA GTGAAGATAAGCATTAATCCCTCTGGAAATCG 401
      * * * * * * * * * * * *

UCP2 | TTCCAGGGGGCTGGGACAGCTGCCTGCATTGCAGATCTCATCACTTTCCCTCTGGATACC 470
UCP3 | TTCC TGGGGGCCGGCACTGCGGCCTGTTTGGCGACCTCCTCACTTTCCCTGGACACC 305
UCP5 | -TCTGCTGAGCTTGAGCAGCTGAGTCCCTTCCCTGTCTT-TCACTTCTT----GGCATC 287
UCP4 | GTCATTGGAGGGATGATGCGCTGGTGTCACTCGGACAGTTTTT AGCCAACCCCACTGACCTT 461
      * * * * * * * * * * * *

UCP2 | GCCAAGGTCCGGCTGCAGATCCAAGGGGAGAGTCAAGGGCTAGT--GCGCACCGCAGCCA 528
UCP3 | GCCAAGGTCCGTCTGCAGATCCAAGGGGAGAACCAGGG-----GCTCA-----GA 351
UCP5 | GGTGGCTTTACTTCTCGATTGAGCTCTGCTTCCCTCGAACCCCGGGAGGCCCGCTCCT 347
UCP4 | GTGAAGGTCCAGATGCAAAATGGAAG--GAAACGCAGACTGGAAGGGAAACC----- 511
      * * * * * * * * * * * *

```

UCP2 | GCGCCAGTACCGTGGCGTTCTGGGTACCATCCTAACCATGGTGCGCACTGAGGGTCCAC 588  
UCP3 | GCGTGCAGTACCGCGGTGTGCTGGGTACCATCCTGACTATGGTGCGCACAGAGGGTCCCC 411  
UCP5 | TACGGCGCTCCCTTCTCTACGAACTCGCTCTGACAGCCGAGGAACTGGCAAGATCCT 407  
UCP4 | -CTTGAGATTCCGTGGAGTACATCATGCATTTGCAAAAATCTTAGCTGAGGAGGAATCC 570  
\* \*\* \* \* \*

UCP2 | GCAGCCTCTACAATGGGCTGGTGC CGCGGCTGCAGCG--CCAGATGAGCTTT--GCCTCC 644  
UCP3 | GCAGCCCTACAGCGGACTGGTGCCTGGCTGCACCG--CCAGATGAGTTT--GCCTCC 467  
UCP5 | GCA-CCCAGAGGGTGAATGGGTATCTTTCCCGAATAATCTAATTTTTCTAAGGGTGA 466  
UCP4 | GCGGGCTTTGGGAGGCTGGATACCCAATATTCAGAGAGC--AGCGCTTGTGAACATGGG 628  
\*\* \* \* \* \* \*

UCP2 | GTCCGCATTGGCCTCTACGACTCTGTCAAAACAGTTCT--ACACC---AAGGGCT-CAGAG 698  
UCP3 | ATTCGAATTGGCCTCTACGACTCTGTCAAGCAGTTCT--ACACCCCAAGGGAG-CGGAC 524  
UCP5 | GTTTGCAACGGCGGCAGTGATTATCAGAAAAGTTCC--ACTTT----AAGCCA-TGAGA 519  
UCP4 | AGATCTAACCC--TTACGACACAGTGAACACTACCTGGTATTGAACACACCGCTTGA 686  
\* \* \*\* \* \* \* \*

UCP2 | CATGCAGGCATCGGAGCCGCCTCCTG-GCA-GGTAGCACACAGGTGCCCTGGCCGTGG 756  
UCP3 | CACTCCAGCGTCGCCATCAGGATTCTG-GCA-GGCTGCACGACAGGAGCCATGGCAGTGA 582  
UCP5 | TGTCTGGTCTGAACTGGAACCTTTTGTGTATGGCGGCTTGCCTCTATTGTTGCCGAGT 579  
UCP4 | GACAAATTTTCCACCCACGGCTTATCCAGTTTG--TGTTCTGGACTTGTGGCTTCTATTC 744  
\* \* \* \* \*

UCP2 | CTGTAGCCAGCCTACAGATGTGGTAAAGGTCCGCTTCCAGGCT----CAGGCCCGGG-- 810  
UCP3 | CCTGCGCCAGCCACGGATGTGGTAAAGGTCCGATTTCAAGCCATGATACGCTTGGGAA 642  
UCP5 | TCGGCATTTCCCTGTGGATCTTACTAAAACACGGCTGCAAGTCC---AAGGCCAGAGTA 636  
UCP4 | TGGGAAC---ACCAGCCGATGTATCAAAAAGCCGAATAATGAACC---AACCTCGAG-A 796  
\* \*\* \*\*\* \* \*\* \*\* \* \* \* \*

UCP2 | CTGGTG-----GTGGTGGAGATACCAGAGCACTGTCGAAGCCTACAAGACCATTG 861  
UCP3 | CTGGAG-----GAGAGAGGAAATACAGAGGGACTATGGATGCCTACAGAACCATCG 693  
UCP5 | TCGATGTTGTTTCAAAGAAATAAATAATAGAGGGATGTTTTCATGCCCTGTTCCGAATCT 696  
UCP4 | CAAACAAGGA----AGGGGACTTTTGTATAAGTCATCAGCTGACTGCTTATCCAGGCTG 852  
\* \*\* \* \*

UCP2 | CACGAGAGGAAGGGATCCGGGCTCTGGAAAGGGACTTCTCCCAATGTTGCCCGTAATG 921  
UCP3 | CCAGGGAGGAAGGAGTCAAGGGCTGTGGAAAGGGACTTGGCCCAACATCACAAGAAATG 753  
UCP5 | AATAAGAAAGGGATCTTGGCTCTGTATTCAGGAA-TTGCCCTGCGTTACTAAGACAG 755  
UCP4 | TTCAAGGGGAAGGCTTCTGAGCCTGTATAAAGGCT-TTCTACCCTCGTGGCTGAGAATG 911  
\* \*\*\*\*\* \* \* \*\* \* \*\* \* \* \* \*

UCP2 | CCATTGT-CAACTGTGCTGAGCTGGTG-ACCTATGACCTCATC-AAAGATACTCTCCTGA 978  
UCP3 | CCATTGT-CAACTGTGCTGAGATGGTG-ACCTACGACATCATC-AAGGAGAGTTGCTGG 810  
UCP5 | GCATCATATGGCACCATCAAAATTGGT-ATTTATCAAAGCTTG-AAGCGATTATTTGTAG 813  
UCP4 | ACCCCTT-GGTCAATGGTGTCTGGCTCACTTATGAAAAATCCGAGAGATGAGTGGAGT 970  
\* \* \* \* \* \* \* \*

UCP2 | AAGCCAACTCATGAC-AGATGACCTCCCTTGCCACTTCACTTCTGCCTTCGGGGCCGGC 1037  
UCP3 | AGTCTCACCTGTTTAC-TGACAACTTCCCTGTCACTTGTCTCTGCCTTGGAGCTGGC 869  
UCP5 | AA---CGTTTGAAGA-TGAGACTCTCCTAATTAACATGATCTGTGGGGTAGTGTGAGGA 869  
UCP4 | CAGCCCATTTTAAGCCCTTAAAGCTAGAGTGTCTATTGTCACTGAACAAGAGCATCTGCG 1030  
\* \* \* \* \*

UCP2 | TTCTGCACCAACCGTCAFCGCCTCCCTGTTGATGTGGTCAAGACGAGATACATGAACTCT 1097  
UCP3 | TTCTGTGCCACAGTGGTGGCCTCCCGGTGGATGTGGTAAAGACCCGATACATGAACGCT 929  
UCP5 | GTGATTTCTCTACTATTGCCAATCCCACTGATGTTCTAAAGATTCTGA---ATGCAGGCT 926  
UCP4 | ACACACGCCCCGTGTTATTTCTACCTCTTTAGGAA----GATACTTTACTCCACAGAGACT 1086  
\* \* \* \* \* \* \* \*

UCP2 | GCCTTGGGCCAGTACCAC---AGCGCAGGTCACTGTGCCCTTACCATGCTCCGGAAGGAG 1154  
UCP3 | CCCCTAGGCAGGTACCGC---AGCCCTCTGCACTGTATGCTGAAGATGGTGGCTCAGGAG 986  
UCP5 | CAAGGAAGTTTGTTCAGGGAGCATGATTGGCAGCTTCAATTGACATATACCAGCAAGAA 986  
UCP4 | GCGATTGACAGGGGGCAGC---ACTTTATCTCTTTATGGAAATCCCCATGGAGCTCCCTCTG 1144  
\* \* \* \* \* \* \*

UCP2 | GGACCCGCGCCTTCTACAAGGGTTCATGCCTTCCTTTCTCCGCTTGGGATCCTGGAAAC1214  
 UCP3 | GGACCCACGGCCTTCTACAAAGGATTTGTGCCCTCCTTTCTGCGTCTGGGAGCTTGGAAAC1046  
 UCP5 | GGTACCAGGGGTCTGTGGAGGGGTGTGGTCCCAACTGCTCAGCGTGCTGCAATCGTTGTG1046  
 UCP4 | ACTCCTCCTTTTACCTAAGAGCAATCTGTCTGGTCCAACTCTCAAGACCAACCACTGAG1204  
 \* \* \* \* \*

UCP2 | GTAGTG-ATGTTTGTACCTATG-AGCAGCTCAAAAGAGCCCTAATGGCTGCCTACCAAT1272  
 UCP3 | GTGATG-ATGTTTGTACATATG-AGCAACTGAAGAGGGCCTTAATGAAAGTCCAGGTAC1104  
 UCP5 | GGAGTA-GAGCTGCCCCTTTATG-ATATTACCAAGAAGCACCTGATAGT--TTCAGGAAT1102  
 UCP4 | ACACAGCAAGGCCTTGGCTAACGGATGGAACCCAGACCACTTTGACCTTGGGCCAGGAGG1264  
 \* \* \* \* \*