

Kinga I. Stańczak-Mrozek, Monika Kolanowska, Paweł Grieb

Zakład Farmakologii Doświadczalnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. med. P. Grieb

Zastosowanie metody Western blot do oznaczania białka rozprzegającego 2 (UCP-2) w mitochondriach osób palących i niepalących

Application of Western blotting for the detection of uncoupling protein-2 (UCP-2) in mitochondria from smokers and non-smokers

Abstract

Introduction: Uncoupling proteins (UCPs) are a family of transmembrane anion transporters present in the inner mitochondrial membrane. UCP-2, which exhibits the widest distribution in various tissues, plays an important role in many physiological processes. Human UCP-2 studies have been hampered by the lack of a method for measuring this protein in an easily accessible human tissue, e.g. blood. The aim of this study was to develop such a method and test its utility by comparing UCP-2 levels in smokers and non-smokers.

Material and methods: Venous blood samples from 10 smoking and 7 non-smoking volunteers were used for the study; lymphocytes were isolated employing Lymphoprep. UCP-2 levels were measured by Western blotting combined with chemoluminescence detection.

Results: Total lymphocyte homogenates were found useless for measuring UCP-2 levels, but it was possible to measure UCP-2 in homogenates of purified lymphocyte mitochondria. There was a significant, though moderate, linear correlation between UCP-2 level and daily cigarette use. UCP-2 level in peripheral blood lymphocytes from smokers was higher than that in non-smokers.

Conclusion: The method for measuring UCP-2 in peripheral blood lymphocytes opens the possibility of UCP-2 screening studies in humans and thus may be useful for studying the role of the protein in human physiology and pathology.

Key words: uncoupling protein-2, lymphocytes, mitochondria, tobacco smoking, Western blotting

Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 118–122

Streszczenie

Wstęp: Białka rozprzegające (UCPs) stanowią rodzinę białek transportujących aniony przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Białko UCP-2 — które jest najszerszej rozpowszechnione w tkankach — odgrywa ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych. Badanie funkcji tego białka u ludzi było utrudnione z powodu braku prostych metod jego pomiaru w łatwo dostępnych tkankach, na przykład we krwi. Celem tej pracy było opracowanie takiej metody i wykonanie pilotowego badania jej przydatności przez porównanie ekspresji białka UCP-2 u osób palących i niepalących.

Materiał i metody: W badaniu wzięło udział 17 ochotników (10 osób palących i 7 niepalących), od których pobrano krew żylną. Z krwi izolowano limfocyty za pomocą Lymphoprepu. Ekspresję UCP-2 oceniano metodą Western blot z detekcją chemoluminescencyjną.

Wyniki: Homogenat całych limfocytów krwi obwodowej okazał się nieprzydatny do mierzenia poziomu UCP-2, wykazano zaś, że dobrym materiałem do takich oznaczeń jest homogenat oczyszczonych mitochondriów z tych komórek. Stwierdzono wyższą ekspresję UCP-2 u osób palących oraz istotną, chociaż umiarkowaną, liniową korelację między ekspresją UCP-2 a liczbą dziennie wypalanych papierosów.

Adres do korespondencji: dr med. Kinga I. Stańczak-Mrozek, University College London, Institute of Neurology, Department of Neurodegenerative Disease, Queen Square, WC1N 3BG London, tel. (+44) 770 9020851, e-mail: kingastanczak@wp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 26.05.2008 r.
Copyright © 2009 Via Medica
ISSN 0867–7077

Wnioski: Opisana metoda oznaczania UCP-2 umożliwia prowadzenie badań przesiewowych nad rolą tego białka w stanach fizjologicznych i patologicznych u ludzi.

Słowa kluczowe: białko rozprzegające 2, limfocyty, mitochondria, palenie tytoniu, Western blot

Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 118–122

Wstęp

Białka rozprzegające (UCPs, *uncoupling proteins*) są białkami transportującymi aniony przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Różne rodzaje tych białek wykryto w większości tkanek ludzkich, między innymi w tkance tłuszczowej, mięśniach szkieletowych, płucach, makrofagach i komórkach układu limfatycznego. Aktywność UCPs zmienia się w zależności od fizjologicznego lub patologicznego stanu organizmu (np. nasila się podczas głodowania oraz w nadczynności tarczycy) i jest regulowana zarówno na poziomie ekspresji tych białek, jak i przez aktywację i hamowanie w mitochondriach [1–3].

Białko UCP-2 jest najbardziej rozpowszechnionym białkiem z rodziny UCP. Główną jego rolą jest rozprzeganie fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach [2, 4], które ma kluczowe znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu komórek. Wykazano, że UCP-2 pełni istotną funkcję w metabolizmie lipidów, odpowiedzi immunologicznej z udziałem makrofagów, wykorzystaniu glukozy, termoregulacji, a także hamowaniu reakcji zapalnej i apoptozy [5].

Istnieją dowody, że UCP-2 odgrywają ważną rolę w regulacji produkcji reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*) w mitochondriach i są częścią komórkowego systemu ochrony przed utleniaczami [1, 4–7]. Z jednej strony, mitochondrialna produkcja ROS jest bardzo wrażliwa na zmiany potencjału chemoosmotycznego [8] i ulega znacznemu osłabieniu po łagodnym rozprężeniu. Z drugiej zaś, produkty utleniania powodowanego przez ROS silnie aktywują przewodnictwo protonowe, zwiększając aktywność UCPs, w tym UCP-2. Doświadczenia na izolowanych szczurzych mitochondriach wykazały, że ekspozycja na ROS lub produkty peroksydacji lipidów może wywołać wzrost aktywności UCP-2 bez zmiany poziomu tego białka; zaproponowano także odpowiedni teoretyczny schemat mechanizmu tego zjawiska [9, 10]. Fizjologiczne zmiany ekspresji UCP-2 podlegają skomplikowanej, wieloczynnikowej regulacji zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji [11].

Wyniki badań na zwierzętach sugerują, że ekspresja i/lub aktywność UCP-2 mogą być wzmo-

żone także w chorobach neurodegeneracyjnych, między innymi w chorobie Alzheimera, Parkinsona, a także w innych chorobach przewlekłych, na przykład w cukrzycy, otyłości czy miażdżycy [6, 11]. Weryfikację roli tych białek u ludzi hamuje, niestety, brak prostych metod ich oznaczania w łatwo dostępnych tkankach ludzkich, na przykład we krwi.

Od dawna wiadomo, że dym papierosowy powoduje wzrost produkcji wolnych rodników u ludzi [12–14], a niedawno przeprowadzone badania wykazały, że ekspozycja myszy na dym papierosowy stymuluje ekspresję szeregu UCPs [15, 16]. Te obserwacje zainspirowały nas do: (1) opracowania metody oznaczania poziomu UCP-2 w ludzkich limfocytach z krwi obwodowej oraz (2) wstępnego zbadania jej przydatności przez porównanie poziomu UCP-2 w limfocytach osób palących i niepalących.

Materiał i metody

W badaniu wzięło udział 17 ochotników, w tym 10 osób palących, którzy zostali przed pobraniem krwi poinformowani o celu doświadczenia, wyrazili pisemnie swoją zgodę na uczestnictwo w badaniu i wypełnili ankietę dotyczącą ogólnego stanu ich zdrowia (tab. 1). Ochotnicy ci wypalili ostatniego papierosa co najmniej dwie godziny przed oddaniem krwi i potwierdzili, że są w dobrym stanie fizycznym, nie chorują na przewlekłe choroby układu oddechowego, sercowo-naczyniowego ani tarczycy, nie mają objawów grypy, przeziębienia lub innych ostrych dolegliwości, które mogłyby wpłynąć na stan układu odpornościowego i wydolność oddechową. Badane grupy nie różniły się istotnie pod względem wieku, płci, wzrostu, wagi i BMI ($p \geq 0,49$). Od każdego ochotnika pobrano 2×10 ml krwi żyłnej, używając jako antykoagulanta cytrynianu sodu. Limfocyty izolowano za pomocą Lymphoprepu (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegia), zawieszano w $500 \mu\text{l}$ buforu o pH 7,6 i składzie: Tris — 15 mM, sacharoza — 250 mM, wersenian sodu (EDTA) — 2 mM, EGTA — 1 mM, MgCl_2 1 mM, fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF) — 0,5 mM, ditiotritol — 1 mM, pH 7,6 i homogenizowano w homogenizatorze Dounce'a (10 uderzeń tłoka). Homogenat ten wirowano 10 minut przy $1000 \times g$ w temperaturze 4°C , osad odrzucano, a z nadsącza izolowano mitochondria

Tabela 1. Somaticzna i demograficzna charakterystyka uczestników badania

Table 1. Somatic and demographic characteristics of the study participants

Palący/ /Niepalący <i>Smoking status</i>	Wiek (lata) <i>Age</i> <i>(years)</i>	Czas trwania nałogu (lata) <i>Habitual smoking</i> <i>duration (years)</i>	Paczkiolata <i>Pack-years</i>	Płeć <i>Gender</i>	Waga [kg] <i>Weight</i>	Wzrost [m] <i>Height</i>	Wskaźnik masy ciała [kg/m ²] <i>BMI</i>
–	25	0	0	M	75	1,76	24,4
–	37	0	0	F	80	1,68	28,3
–	28	0	0	F	65	1,74	21,5
–	32	0	0	F	52	1,55	21,5
–	58	0	0	F	70	1,75	22,9
–	49	0	0	F	62	1,59	24,5
–	29	0	0	F	45	1,58	17,9
+	27	3	1,5	F	65	1,69	22,8
+	26	8	15	F	50	1,66	18,1
+	51	30	0,5	F	78	1,65	28,7
+	54	30	12,5	M	78	1,82	23,5
+	24	5	3	F	60	1,67	21,5
+	50	30	1,75	F	52	1,60	20,3
+	26	10	3,6	F	45	1,60	17,6
+	55	25	2	F	60	1,60	23,4
+	39	3	22,5	F	58	1,70	20,1
+	36	7	60	F	74	1,74	24,4

M (*male*) — mężczyzna; F (*female*) — kobieta

przez odwirowanie przy $17\ 000 \times g$ przez 20 minut w temperaturze 4°C . Tę „surową” frakcję mitochondrialną zawieszano (worteksując) w $250\ \mu\text{l}$ buforu homogenizacyjnego, mieszano z 1 ml 12-procentowego roztworu fikolu w płynie Krebsa-Ringera i wirowano 30 minut przy $100\ 000 \times g$ w temperaturze 4°C . Tak oczyszczony osad mitochondriów zawieszano w $250\ \mu\text{l}$ buforu homogenizacyjnego i sonikowano aparatem CP-130 (Linemaster Switch Corp., Woodstock, CT, USA) w $0-4^{\circ}\text{C}$ przez 1 minutę przy amplitudzie 80 i mocy wyjściowej 0,4 W. Homogenat natychmiast zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu oznaczenia UCP-2. Stężenie białka w homogenatach oznaczano metodą Bradford, używając albuminy bydlęcej jako wzorca. Do oznaczeń rozcieńczano homogenaty buforem Laemmliego [17] i ogrzewano przez 5 minut we wrzącej łaźni wodnej. Tak przygotowane próbki oraz mieszaninę białek wzorcowych (Prestained SDS-Page Standards, broad-range; Bio-Rad Laboratories) nakładano na 12-procentowy żel poliakrylamidowy ($40\ \mu\text{g}$ białka/ścieżkę) i poddawano elektroforezie. Po rozdzielaniu białka elektrotransfe-

rowano na błony nitrocelulozowe (Amersham), które następnie blokowano odtłuszczonym mlekiem krowim i inkubowano przez noc z poliklonalnym przeciwciałem króliczym przeciw ludzkiemu UCP-2 (Calbiochem; rozc. 1:500), a następnie przez 20 minut z koniugatem koziej IgG przeciw antygenom królika i peroksydazy chrzanowej (Sigma; rozc. 1:5000). Po inkubacji błony wywoływano przy użyciu zestawu chemiluminescencyjnego (ECL; Amersham), a otrzymane obrazy ECL analizowano za pomocą komputerowego systemu do analizy obrazów GelExpert 4 (Nucleo-Tech, San Mateo, CA, USA).

Statystyczną analizę danych wykonano za pomocą programu Statistica v. 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Międzygrupowe różnice w poziomie UCP-2 oraz korelację między liczbą wypalanych papierosów lub mierzonym liczbą paczkiolat „stażem” danej osoby jako palącej a poziomem białka UCP-2 badano przy użyciu, odpowiednio, testu *U* Manna-Whitneya i testu korelacji rangowej Spearmana lub testu korelacji liniowej, przyjmując $p = 0,05$ jako próg istotności statystycznej.

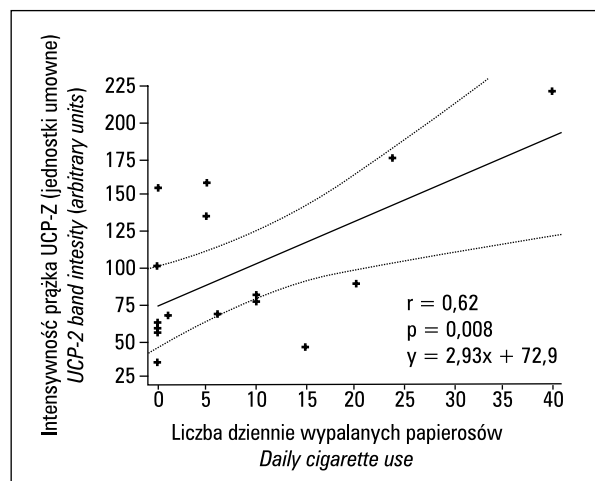
Wyniki

Próby pomiaru ilości białka UCP-2 w homogenacie z całych limfocytów się nie powiodły. Ponieważ UCPs (kodowane przez genomowe DNA) tuż po translacji są szybko przenoszone do wewnętrznej błony mitochondrialnej i znaczące ich ilości można znaleźć tylko w mitochondriach [3], uznaliśmy, że przyczyną był zbyt niski poziom UCP-2 w takich homogenatach. To skłoniło nas do mierzenia UCP-2 w homogenatach mitochondrialnej frakcji homogenatu limfocytów. To podejście pozwoliło wykryć UCP-2 we wszystkich badanych próbkach. Stwierdzono statystycznie znaczącą, dodatnią korelację między poziomem UCP-2 w homogenatach mitochondrialnych a liczbą dziennie wypalanych papierosów (ryc. 1), nie stwierdzono zaś istotnej korelacji między tym poziomem UCP-2 a mierzonym paczkolatami „stażem” osób palących (wsp. korelacji liniowej $r = 0,22$, $p = 0,53$, współczynnik korelacji rangowej Spearmana $R = 0,21$, $p = 0,56$). Różnica między poziomami UCP-2 u osób palących i niepalących nie osiągnęła wartości statystycznie istotnej, ale zauważalna tendencja ($p = 0,079$; ryc. 2) do podwyższenia poziomu tego białka u osób palących była w zgodzie z wynikami badań na zwierzętach [15]. Wykluczenie najwyższego wyniku w grupie osób niepalących (który się różnił od średniej o dwa SD) spowodowało, że różnica ta osiągnęła znaczącość statystyczną ($p = 0,03$).

Omówienie

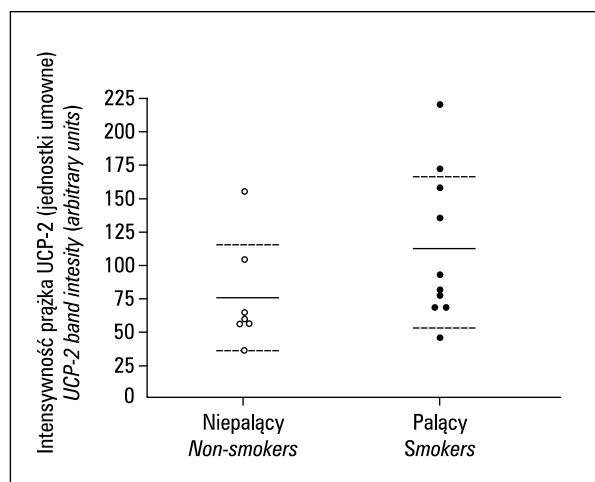
Osoby palące mają średnio niższą masę ciała niż osoby niepalące tej samej płci i w tym samym wieku [18, 19], a zaprzestanie palenia tytoniu bez zastosowania substytucji nikotynowej powoduje zwykle wzrost masy ciała [13]. Podstawą tego procesu może być zaburzenie homeostazy energetycznej organizmu powodowane przez niektóre składniki dymu papierosowego [15], ale szczegóły mechanizmu tego zjawiska nie zostały wyjaśnione.

Wyniki badań na ludziach i zwierzętach wskazują, że nikotyna hamuje łaknienie i obniża ilość spożywanego pokarmu [15, 16], co sugeruje, że zaprzestanie palenia tytoniu może się wiązać ze zwiększeniem łaknienia i wzrostem spożycia pokarmu. Długotrwała ekspozycja na dym papierosowy może — mimo obniżania poziomu leptyny w krwi — działać anorektycznie przez obniżanie wydzielania neuropeptydu Y z zakończeń neuronów jądra łukowatego w jądrze przykomorowym podwzgórza [16]. Jednak wyniki innych badań wskazują, że osoby przyjmują-



Rycina 1. Korelacja pomiędzy poziomem UCP-2 a liczbą wypalanych papierosów. Linią przerywaną zaznaczono 95-procentowy przedział ufności

Figure 1. Correlation between UCP-2 level and cigarette use. Dashed curves denote 95% confidence limits



Rycina 2. Intensywność zabarwienia prążków białka UCP-2 u osób niepalących i palących (pomiar densytometryczny). Linią ciągłą zaznaczono średnią, a linią przerywaną — odchylenie standardowe

Figure 2. UCP-2 band intensity in non-smokers and smokers. Solid lines denote mean values, dashed lines denote standard deviation

ce w dymie papierosowym dużą dawkę nikoty-ny mają zwiększony spoczynkowy wydatek energetyczny i metabolizują — dla jego podtrzymania — więcej lipidów niż osoby niepalące. Dlatego osoby, które paliły dużo, rzucając palenie, powinny zmniejszać ilość spożywanego lipidów, gdyż zachwianie równowagi pomiędzy ich przyjmowaniem a zużyciem może powodować przyrost ilości tkanki tłuszczowej [18].

Ekspozycja na dym papierosowy powoduje także zmiany w produkcji cytokin prozapalnych,

na przykład TNF- α i IL-6, w różnych tkankach i w ten sposób może między innymi interferować z różnicowaniem się komórek tłuszczowych, stymulować lipolizę, zmniejszać łaknienie i powodować kacheksję [15, 16]. TNF- α potrafi hamować różnicowanie się komórek tłuszczowych *in vitro*, a także stymuluje lipolizę i zmniejsza łaknienie [15]. Interesujące byłoby sprawdzenie, czy TNF- α wzmacnia ekspresję genów kodujących UCPs, co mogłoby się przyczynić do zmian w metabolizmie lipidów u osób palących.

Jak wspomniano we wstępie, stres oksydacyjny wzmacnia ekspresję UCPs. Palenie tytoniu może powodować wzrost produkcji ROS, wpływając przez to na ekspresję UCP-2 w limfocytach. Uważa się, że UCP-2 pełni w komórkach rolę ochronną dzięki ograniczaniu produkcji wolnych rodników [3]. Przybywa także danych wskazujących na to, że UCP-2 uczestniczy w modulowaniu metabolizmu lipidów i zużycia energii [2, 20–22]; doniesiono między innymi, że poziom mRNA dla UCP-2 w adipocytach koreluje dodatnio z tempem spoczynkowym metabolizmu [20]. Ponadto wykazano, że trijodotyronina (która wyraźnie zwiększa zużycie energii) aktywuje ekspresję mRNA dla UCP-2 w mięśniach szkieletowych [21], co sugeruje, że spadek ekspresji UCP-2 może się przyczynić do rozwoju otyłości. Z naszych badań wynika, że poziom UCP-2 jest niższy u osób niepalących niż u palących, co również wskazuje, że pewną rolę w procesie tycia po zaprzestaniu palenia może odgrywać spadek ekspresji tego białka.

Wnioski

Opisana przez nas metoda pozwala mierzyć poziom UCP-2 w limfocytach krwi obwodowej i może być przydatna w badaniach nad rolą tego białka w stanach fizjologicznych i patologicznych u ludzi.

Podziękowania

Przeprowadzone badania były sponsorowane przez Fundację Rozwoju Diagnostyki i Terapii w Warszawie. Autorzy dziękują dr. Stanisławowi J. Chrapuście z IMDiK PAN w Warszawie za wskazówki dotyczące opracowania wyników i zredagowania tekstu tej pracy.

Piśmiennictwo

- Rousset S., Alves-Guerra M.C., Mozo J. i wsp. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 2004; 53: 130–135.
- Schrauwen P., Hesselink M. UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J. Exp. Biol.* 2002; 205: 2275–2285.
- Ledesma A., de Lacoba M.G., Rial E. The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol.* 2002; 3: Reviews 3015.1–3015.9.
- Samec S., Seydoux J., Dulloo A.G. Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipid as fuel substrate? *FASEB J.* 1998; 12: 715–724.
- Xiao H., Massaro D., Massaro G.D., Clerch L.B. Expression of lung uncoupling protein-2 mRNA is modulated developmentally and by caloric intake. *Exp. Biol. Med.* 2004; 229: 479–485.
- Brand M.D., Esteves T.C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2005; 2: 85–93.
- Negre-Salvayre A., Hirtz C., Carrera G. i wsp. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* 1997; 11: 809–815.
- Szlagatys-Sidorkiewicz A., Góra-Gębka M., Korzon M. Reaktywne formy tlenu i bariera antyoksydacyjna w astmie. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2007; 75: 158–162.
- Echtay K.S., Murphy M.P., Smith R.A., Talbot D.A., Brand M.D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 47 129–47 135.
- Murphy M.P., Echtay K.S., Blaikie F.H. i wsp. Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from α -phenyl-*N*-*tert*-butylnitron. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 48 534–48 545.
- Mattiasson G., Sullivan P.G.: The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxid. Redox Signal.* 2006; 8: 1–38.
- Reddy Thavanati P.K., Kanala K.R., de Dios A.E., Cantu Garza J.M.: Age-related correlation between antioxidant enzymes and DNA damage with smoking and body mass index. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2008; 63: 360–364.
- Filozof C., Fernandez Pinilla M.C., Fernandez-Cruz A. Smoking cessation and weight gain. *Obes. Rev.* 2004; 5: 95–103.
- Chorostowska-Wynimko J. Wpływ palenia tytoniu na mechanizmy komórkowe w układzie oddechowym. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2008; 76: 174–179.
- Chen H., Vlahos R., Bozinovski S., Jones J., Anderson G.P., Morris M.J. Effect of short-term cigarette smoke exposure on body weight, appetite and brain neuropeptide Y in mice. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 713–719.
- Chen H., Hansen M.J., Jones J.E. i wsp. Cigarette smoke exposure reprograms the hypothalamic neuropeptide Y axis to promote weight loss. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 173: 1248–1254.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
- Wack J.T., Rodin J. Smoking and its effects on body weight and the systems of caloric regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 1982; 35: 366–380.
- Chatkin R., Chatkin J.M. Smoking and changes in body weight: can physiopathology and genetics explain this association? *J. Bras. Pneumol.* 2007; 33: 712–719.
- Barbe P., Millet L., Larrouy D. i wsp. Uncoupling protein-2 messenger ribonucleic acid expression during very-low-calorie diet in obese premenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83: 2450–2453.
- Barbe P., Larrouy D., Boulanger C. i wsp. Triiodothyronine-mediated up-regulation of UCP2 and UCP3 mRNA expression in human skeletal muscle without coordinated induction of mitochondrial respiratory chain genes. *FASEB J.* 2001; 15: 13–15.
- Chevillotte E., Giral M., Miroux B., Ricquier D., Villarroya F. Uncoupling protein-2 controls adiponectin gene expression in adipose tissue through the modulation of reactive oxygen species production. *Diabetes* 2007; 56: 1042–1050.