

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Igor Lj. Golić

MOLEKULSKE OSNOVE STRUKTURNOG
REMODELIRANJA MITOHONDRIJA INDUKOVANOG
KALCIJUMOM I INSULINOM U MRKIM
ADIPOCITIMA PACOVA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Igor Lj. Golić

MOLECULAR BASIS OF MITOCHONDRIAL
STRUCTURAL REMODELING INDUCED BY CALCIUM
AND INSULIN IN RAT BROWN ADIPOCYTES

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2015.

Komisija za odbranu doktorske disertacije

MENTORI

dr Aleksandra Korać

redovni profesor, Biološki fakultet

Univerzitet u Beogradu

dr Vesna Otašević

viši naučni saradnik, Institut za biološka

istraživanja "Siniša Stanković"

Univerzitet u Beogradu

ČLAN KOMISIJE

dr Bato Korać

vanredni profesor, Biološki fakultet

naučni savetnik, Institut za biološka

istraživanja "Siniša Stanković"

Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekta 173055: "Belo ili/i mrko: značaj masnog tkiva u održanju ukupne redoks zavisne metaboličke kontrole u fiziološkim adaptacijama i metaboličkim poremećajima" Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, i to na Katedri za biologiju ćelija i tkiva i pri Centru za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Dio disertacije je realizovan u okviru bilateralne saradnje između Republike Srbije i Republike Francuske (Pavle Savić/Hubert Curien).

Zadovoljstvo mi je da se zahvalim svima zaslužnima što je ova doktorska disertacija ugledala svjetlost dana, i to:

PROF. DR ALEKSANDRI KORAĆ, mom mentoru i učitelju, što me naučila da u moru indirektnih i zavodljivih činjenica ostanem nevjerni Toma, sve dok golim okom ne vidim dokaz i da je najvažniji princip za nas - "seeing is believing". Hvala na velikoj intelektualnoj slobodi, ukazanom povjerenju, podršci i savjetima tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

DR VESNI OTAŠEVIĆ, na prenesenom iskustvu, pomoći, savjetima i sugestijama u istraživačkom radu, a i tokom pisanja disertacije.

PROF. DR BATU KORAĆU, što me je od početka naučio pravilnom izvođenjem eksperimenata i neprestanom brigom za kvalitetom. A i na korisnim razgovorima, prenijetom znanju i savjetima pri pisanju ove disertacije.

DR SLAVICI JONIĆ, na nesebičnoj pomoći pri realizaciji dijela doktorske disertacije, prije svega tomografskoj rekonstrukciji mitohondrija.

KSENIJI i MILICI, za nesebičnu pomoć i savjetima tokom istraživanja i realizacije ove disertacije, a i za razumijevanje, momente razbibrige, drugarstvo i kolegijalnost.

ALEKSANDRI, ANI i MILICI, neizmjereno hvala na prenijetom znanju, malim laboratorijskim tajnama, strpljenju i razumijevanju, a i za pomoć pri izradi ove disertacije.

MARIJI što mi je bila pri ruci u posljednjim i kritičnim fazama eksperimentalnog dijela disertacije, a i za drugarstvo. ANITI i MAJI za nesebičnu pomoć pri pripremanju presjeka i izradi elektron mikrografija za rad.

Mojoj Majci i Kumi,
Zahvalan na bezrezervnoj ljubavi
i neprestanoj podršci

*Čim nauku i razum prezire ko,
A najveća je ljudska snaga to,*

...

*Pa da i nije đavlu dušu pred'o već,
Svejedno morao bi propasti!*

J. W. GOETHE (FAUST)

*Naučnik u svojoj laboratoriji nije samo tehničar;
on je i dijete koje se suočava sa prirodnim fenomenima
koji ga toliko impresioniraju kao da se radi o bajkama.*

MARIE CURIE

Molekulske osnove strukturnog remodeliranja mitohondrija indukovanog kalcijumom i insulinom u mrkim adipocitima pacova

REZIME

Osnovna uloga mrkog masnog tkiva je održanje tjelesne temperature i održanje energetske homeostaze organizma. Izlaganje hladnoći, a i povećan unos hrane, dovodi do stimulacije, proliferacije i diferencijacije mrkih adipocita, što je praćeno remodeliranjem mitohondrija, termogenih organela mrkih adipocita. U okviru strukturnog remodeliranja mitohondrije pokazuju širok dijapazon morfoloških promjena (broj mitohondrija u ćeliji, srednji dijametar, fuzija i fisija mitohondrija, volumenska gustina kristi) što je povezano sa prisustvom pojedinih kompleksa elektron transportnog lanca, ATP sintaze, familije UCP proteina, posebno UCP₁, a i drugih proteina unutrašnje membrane mitohondrija.

Kalcijum igra veoma važnu ulogu u termogenezi, njegova koncentracija u citoplazmi i organelama mrkih adipocita je hormonski regulisana, prije svega noradrenalinom. Mitohondrije, s jedne strane, imaju važnu ulogu u oblikovanju signalnih puteva kalcijuma, a kalcijum, s druge strane, u fiziološkim koncentracijama stimuliše mitohondrijalni metabolizam i povećava produkciju energije, dok u visokim koncentracijama indukuje apoptozu.

Insulin je jedan od glavnih modulatora termogene funkcije mrkih adipocita, gdje stimuliše sintezu i deponovanje lipida u mrkim adipocitima, proliferaciju mrkih adipocita, angiogenezu i vazodilataciju. Pokazano je da insulin utiče na aktivnost elektron transportnog lanca, a i da mitohondrije pojačavaju insulinsku osjetljivost putem redoks regulacije proteina tirozin kinaze i insulinskog receptora.

Cilj ove doktorske disertacije je rasvjetljavanje kako kalcijum, s jedne strane, a insulin, s druge strane, utiču na molekulske mehanizme koje su uključene u strukturno remodeliranje mitohondrija mrkih adipocita pacova.

U eksperimentu su korišćeni Wistar pacovi, starosti dva mjeseca. U eksperimentu sa Ca-SANDOZ, životinje su podijeljene u dve grupe, jedna je pila Ca-SANDOZ rastvoren u vodi, a druga, kontrolna, česmensku vodu, tri dana. U eksperimentu sa insulinom, pacovi su podijeljeni u šest grupa, četiri grupe su primale nisku (0.4 IU) ili visoku (4 IU) dozu insulina i to jedan (akutno) ili tri dana (hronično). Ostale dvije grupe, kontrolne, su primale fiziološki rastvor akutno ili hronično. Trećeg dana tretmana Ca-SANDOZ, odnosno tri sata poslije posljednjeg tretmana insulinom, životinje su žrtvovane dekapitacijom, a interskapularni depo BAT je izolovan i pripremljen za biohemijske, mikroskopske i molekularno-biološke analize, i za izolaciju mitohondrijalnih frakcija. BAT i mitohondrijama bogata frakcija su analizirane Western Blot analizom, imunohistohemijskom, imunofluorescentnom i imunogold analizama, ultrastrukturnim i stereološkim analizama, a analizirana je i aktivnost ATP sintaze.

Alizarin Red S bojenje je pokazao povećanu koncentraciju Ca^{2+} u mrkim adipocitima tretiranih Ca-SANDOZ, a kalijum piroantimonat je lokalizovao Ca^{2+} -bogate regione u citoplazmi, mitohondrijama i oko lipidnih tijela. Ca-SANDOZ smanjio je broj mitohondrija, ali je povećao njihovu veličinu i volumensku gustinu kristi. Transmisiona elektronska mikroskopija je pokazala brojne izdužene i "fuzionisane" mitohondrije u Ca-SANDOZ grupi, kao i megamitohondrije u pojedinim mrkim adipocitima. Ca-SANDOZ utiče na mitohondrijalnu fuziju povećanjem proteinske ekspresije Mfn1 i Mfn2, a smanjenjem Drp1. Konfokalna mikroskopija je pokazala povećan stepen kolokalizacije mitohondrija i endoplazminog retikuluma. Nivo UCP1 proteina je povećan, što je potvrđeno Western blot analizom i imunohistohemijom. Ovi rezultati ukazuju da Ca-SANDOZ stimuliše fuziju mitohondrija, povećava kontakte između mitohondrija i endoplazminog retikuluma i povećava termogeni kapacitet mrkih adipocita pacova.

Western blot analiza mitohondrijama bogate frakcije je pokazala da akutni tretman insulinom dovodi do povećanja, a hronični tretman insulinom do smanjenja proteinske ekspresije svih kompleksa elektron transportnog lanca, osim kompleksa II i IV, kojima je proteinska ekspresija takođe povećana primjenom niske, a hronične doze insulina. Proteinska ekspresija UCP1 je smanjena poslije akutnog tretmana insulinom, ali je povećana hroničnim tretmanom. Niska, hronična doza insulina dovodi do povećanja proteinske ekspresije UCP2 proteina, a visoka doza smanjuje. Proteinski sadržaj UCP3 je povećan i akutnim i hroničnim tretmanom insulinom, nezavisno od doze. U slučaju ATP sintaze, promjena proteinske ekspresije je praćena navedenom proteinskom ekspresijom kompleksa elektron transportnog lanca, a proteinska ekspresija anti-ATPaznog inhibitornog faktora (IF_1) je povećana u svim tretiranim grupama, što se i poklapa sa aktivnošću ATP sintaze. Konfokalna mikroskopija je pokazala, i u kontrolnoj grupi, da pojedini mrki adipociti posjeduju dominantno tip mitohondrija koje su imunopozitivne na UCP1 ili pojedinačni kompleks elektron transportnog lanca ili ATP sintazu, a drugi mrki adipociti posjeduju mitohondrije sa različitim imunopozitivnošću na navedene proteine. Osim toga, uočeni su pojedini mrki adipociti sa kolokalizacijom navedenih proteina u određenoj populaciji mitohondrija. Ovo ukazuje da se mrki adipociti odlikuju funkcijom heterogenošću mitohondrija, odnosno prisutan je mitohondrijalni mozaicizam. Štaviše, kompleksi elektron transportnog lanca, ATP sintaza i UCP1 kolokalizuju u različitim stepenu u različitim mitohondrijama unutar pojedinačnog mrkog adipocita, i taj efekat je i dozno i vremenski zavisna. Navedeni rezultati ukazuju da insulin modulira bioenergetski i termogeni kapacitet mrkih adipocita *in vivo* modulacijom mitohondrijalnog mozaicizma.

KLJUČNE RIJEČI: mitohondrije, mrki adipociti, insulin, kalcijum, ATP sintaza, IF_1 , elektron transportni lanac, UCP1, mitohondrijalno remodeliranje

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Biologija ćelija i tkiva

UDK BROJ: [546.41+612.349.8]:[577.112.82/.112.85:576.347](043.3)

Molecular basis of mitochondrial structural remodeling induced by calcium and insulin in rat brown adipocytes

ABSTRACT

Essential role of brown adipose tissue is maintaining body temperature and energy homeostasis of organism. Exposure to cold and increased diet intake lead to stimulation, proliferation and differentiation of brown adipocytes, what is followed by remodeling of mitochondria, thermogenic organelles of brown adipocytes. In the context of structural remodeling, mitochondria show wide repertoire of morphological changes (e.g. mitochondria number in cell, mean diameter, fusion and fission of mitochondria, volume density of mitochondrial cristae) what is connected with abundance of components of electron transport chain (ETC), ATP synthase, UCP proteins - especially UCP₁ protein, and other proteins of inner mitochondrial membrane.

Calcium plays important role in thermogenesis, and its concentration in cytosol and organelles of brown adipocytes is hormone regulated, particularly by noradrenaline. Mitochondria has essential role in shaping calcium signaling pathways, and calcium, on other hand, stimulates mitochondrial metabolism and increases energy production, but in high concentrations induces apoptosis.

Insulin is one of major modulators of thermogenic function of brown adipocytes, and stimulates synthesis and storage of lipids in brown adipocytes, proliferation of brown adipocytes, angiogenesis and vasodilatation. It is showed that insulin has effect on electron transport chain activity, but also mitochondria enhances insulin sensitivity *via* redox regulation of tyrosine kinases and insulin receptor.

The aim of this doctoral dissertation is elucidation how calcium and insulin effect on molecular mechanisms involved in structural remodeling of mitochondria of rat brown adipocytes.

Two-month-old male Wistar rats were used. In Ca-SANDOZ study, they were divided into two groups - Ca-SANDOZ drinking or tap water drinking for three days. In insulin experiment, rats were divided into six groups, where four groups treated with low (0.4 IU) or high (4 IU) dose of insulin, for one (acutely) or three (chronically) days. Another two groups served as control, treated with 0.9% saline solution for one or three days. On third day of Ca-SANDOZ treatment, or three hours after last administration of insulin, they were sacrificed by decapitation, and interscapular portion of BAT was isolated and prepared for biochemical, microscopic and molecular biology analyses, also for isolation of mitochondria-enriched BAT fraction. BAT and mitochondria-enriched fraction were analyzed by Western blot analysis, immunohistochemical, immunofluorescent, immunogold, ultrastructural and stereological

analyses. Also, ATP synthase activity was measured.

Alizarin Red S staining showed increased Ca^{2+} level in rat brown adipocytes, and potassium pyroantimonate staining localized Ca^{2+} -rich regions in the cytoplasm, mitochondria and around lipid droplets. Ca-SANDOZ decreased mitochondrial number, but increased their size and mitochondrial cristae volume. Transmission electron microscopy revealed numerous enlarged and fusioned-like mitochondria in Ca-SANDOZ treated group compared to the control, and megamitochondria in some brown adipocytes. Ca-SANDOZ affected mitochondrial fusion increasing Mfn1 and Mfn2 protein level, and decreasing Drp1 protein level. Confocal microscopy showed a higher colocalization rate between functional mitochondria and endoplasmic reticulum (ER). The level of UCP₁ was elevated, which was confirmed by Western blot analysis and immunohistochemistry. These results suggests that Ca-SANDOZ stimulates mitochondrial fusion, increases mitochondria-ER contacts and the thermogenic capacity of rat brown adipocytes.

Western blot analysis of mitochondria-enriched BAT fraction revealed that acute insulin treatment increased, whereas chronic insulin treatment decreased expression of all ETC complexes except complex II and IV, which were up-regulated by a low insulin dose and chronic treatment, respectively. UCP₁ expression decreased after acute treatment but increased following chronic insulin treatment. A chronic low dose of insulin increased UCP₂ content, but a high dose had the opposite effect. Protein content of UCP₃ was increased by both acute and chronic insulin treatment. ATP synthase expression mirrored that of the ETC complexes, while the anti-ATPase inhibitory factor (IF₁) expression was elevated in all treatment groups, in line with ATP synthase activity. Confocal microscopy showed that some brown adipocytes from control group contained only one type of mitochondria that were immunopositive for UCP₁, ETC complex or ATP synthase, while others were of mixed type that did or did not show colocalization. These results indicated mitochondrial functional heterogeneity or mitochondrial mosaicism in brown adipocytes. Furthermore, ETC complexes, ATP synthase and UCP₁ were found to colocalize differently in different mitochondria within a single brown adipocyte, and this effect was both dose and time dependent. These results suggest that insulin modulates the bioenergetic and thermogenic capacity of rat brown adipocytes *in vivo* by modulating mitochondrial mosaicism.

KEYWORDS: mitochondria, brown adipocyte, insulin, calcium, ATP synthase, IF₁, electron transport chain, UCP₁, mitochondrial remodeling

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIAL TOPICS: Cell and Tissue Biology

UDC NUMBER: [546.41+612.349.8]:[577.112.82/.112.85:576.347](043.3)

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	O mitohondrijama...	1
1.2	Mrki adipociti	2
1.3	Mitohondrije i bioenergetika	2
1.3.1	Elektron transportni lanac	4
1.3.1.1	Kompleks I	4
1.3.1.2	Kompleks II	4
1.3.1.3	Kompleks III	5
1.3.1.4	Kompleks IV	5
1.3.2	ATP sintaza	6
1.3.3	Inhibitorski faktor 1 (IF ₁)	7
1.3.4	UCP proteini	8
1.3.4.1	UCP ₁	8
1.3.4.2	UCP ₂ i UCP ₃	9
1.4	Energetska stanja izolovanih mitohondrija i njihov izgled	10
1.5	Unutrašnja arhitektura mitohondrija	11
1.5.1	Uticaj ATP sintaze na arhitekturu kristi	12
1.5.2	Respiratorni superkompleksi	13
1.6	Remodeliranje mitohondrija	14
1.7	Mitohondrije, ER i kalcijum	17
1.8	Mrki adipociti i kalcijum	18
1.9	Mrki adipociti i insulin	19
2	CILJ	22
3	MATERIJAL I METODI	24
3.1	Eksperimentalne životinje	24
3.2	Eksperimentalni dizajn Ca-SANDOZ tretmana	24
3.3	Eksperimentalni dizajn tretmana insulinom	24

3.4	Žrtvovanje životinja i izolacija	25
3.5	Izolacija mitohondrijama bogate frakcije	26
3.6	Priprema tkiva za analize	26
3.6.1	Priprema tkiva za Western Blot analizu	26
3.6.2	Priprema tkiva za svjetlosnu i konfokalnu mikroskopiju	27
3.6.3	Priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju	27
3.7	Priprema krvnih razmaza	27
3.8	Priprema mitohondrijama bogate frakcije za analize	28
3.8.1	Priprema mitohondrijama bogate frakcije za Western Blot analizu	28
3.8.2	Priprema mitohondrijama bogate frakcije za elektronsku mikroskopiju	28
3.9	Određivanje koncentracije proteina	28
3.9.1	Određivanje koncentracije proteina tkiva	28
3.9.2	Određivanje koncentracije proteina iz mitohondrijama bogate frakcije	28
3.10	SDS-PAGE i Western Blot	29
3.11	Detekcija proteina nakon Western Blot analize	29
3.12	Određivanje aktivnosti ATP sintaze	30
3.13	Lokalizacija proteina mikroskopskim metodima	31
3.13.1	Imunohistohemijska lokalizacija proteina	32
3.13.2	Imunofluorescentna lokalizacija proteina	33
3.13.3	Imunogold lokalizacija proteina	33
3.14	Lokalizacija kalcijuma mikroskopskim metodama	35
3.14.1	Alizarin Red S bojenje	35
3.14.2	Precipitacija kalijum piroantimonatom	35
3.15	Kolokalizaciona studija mitohondrija i endoplazminog retikuluma	35
3.16	Ultrastrukturalna analiza tkiva i mitohondrijama bogate frakcije	36
3.16.1	Tomografska rekonstrukcija mitohondrija	36
3.16.2	Ultrastrukturalna analiza mitohondrija	37
3.17	Citohemijska analiza kompleksa I i II <i>in situ</i>	37
3.18	Stereološke analize	38
3.18.1	Stereološka analiza mrkih adipocita	38
3.18.2	Stereološka analiza lipidnih tijela	38
3.18.3	Stereološka analiza mitohondrija	38
3.19	Statističke analize	39
4	REZULTATI	40
4.1	Ca-SANDOZ tretman	40
4.1.1	Western blot analiza	40
4.1.1.1	Proteinska ekspresija Mfn1 i Mfn2	40

4.1.1.2	Proteinska ekspresija Drp1	40
4.1.1.3	Proteinska ekspresija ATP sintaze	41
4.1.1.4	Proteinska ekspresija UCP1	41
4.1.1.5	Proteinska ekspresija VDAC	42
4.1.1.6	Proteinska ekspresija kalneksina	42
4.1.2	Mikroskopske analize	43
4.1.2.1	Lokalizacija kalcijuma u mrkim adipocitima	43
4.1.2.2	UCP1 imunohistohemija	44
4.1.2.3	Stereološka analiza mrkih adipocita i lipidnih tijela	44
4.1.2.4	Kolokalizaciona analiza mitohondrija i ER	45
4.1.3	Ultrastrukturne analize	45
4.1.3.1	Egzovezikulacija eritrocita i ulaz eritrocitnih kompleksa u mrke adipocite i mitohondrije	45
4.1.3.2	Ultrastrukturna analiza mitohondrija	46
4.1.3.3	Stereološka analiza mitohondrija	46
4.1.3.4	Distribucija mitohondrija po srednjem dijametru	47
4.1.3.5	Distribucija mitohondrija po volumenskoj gustini kristi	47
4.2	Tretman insulinom	47
4.2.1	Western blot analiza mitohondrijama bogate frakcije	47
4.2.1.1	Proteinska ekspresija kompleksa elektron transportnog lanca i <i>cyt c</i>	47
4.2.1.2	Proteinska ekspresija ATP sintaze i IF1	48
4.2.1.3	Proteinska ekspresija UCP1, UCP2 i UCP3	48
4.2.1.4	Proteinska ekspresija VDAC	50
4.2.2	Western blot analiza tkiva	51
4.2.2.1	Proteinska ekspresija kompleksa elektron transportnog lanca i <i>cyt c</i>	51
4.2.2.2	Proteinska ekspresija ATP sintaze i IF1	52
4.2.2.3	Proteinska ekspresija UCP1 i UCP2	52
4.2.2.4	Proteinska ekspresija VDAC	53
4.2.2.5	Proteinska ekspresija katalaze	53
4.2.2.6	Proteinska ekspresija kalneksina	54
4.2.3	Biohemijska analiza	54
4.2.3.1	Aktivnost ATP sintaze	54
4.2.4	Mikroskopske analize	61
4.2.4.1	Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa I i UCP1	61
4.2.4.2	Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa II i UCP1	62

4.2.4.3	Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa III i UCP ₁	63
4.2.4.4	Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa IV i UCP ₁	64
4.2.4.5	Imunofluorescentna lokalizacija <i>cyt c</i> i UCP ₁	65
4.2.4.6	Imunofluorescentna lokalizacija ATP sintaze i UCP ₁	65
4.2.4.7	Imunofluorescentna lokalizacija IF ₁ i UCP ₁	66
4.2.4.8	Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa III i IV	67
4.2.4.9	Imunofluorescentna lokalizacija ATP sintaze i IF ₁	68
4.2.4.10	Imunofluorescentna lokalizacija VDAC i kalneksina	69
4.2.4.11	Imunofluorescentna lokalizacija katalaze	70
4.2.4.12	Imunofluorescentna lokalizacija Mfn ₁	70
4.2.4.13	Imunohistohemijska lokalizacija Mfn ₁	71
4.2.4.14	Imunohistohemijska lokalizacija Drp ₁	72
4.3	Ultrastrukturne analize	84
4.3.0.1	TEM mitohondrijama bogate frakcije	84
4.3.0.2	Citohemijska analiza kompleksa I <i>in situ</i>	85
4.3.0.3	Citohemijska analiza kompleksa II <i>in situ</i>	85
4.3.0.4	Citohemijska lokalizacija vodonik peroksida	85
4.3.0.5	Tomografska rekonstrukcija mitohondrija	86
4.3.0.6	Imunogold lokalizacija kompleksa III i kompleksa IV	86
5	DISKUSIJA	92
5.1	Ca-SANDOZ tretman	92
5.1.1	Povećanje nivoa kalcijuma u mrkim adipocitima	92
5.1.2	Strukturno remodeliranje mitohondrija	93
5.1.3	Povećanje termogenog kapaciteta mrkih adipocita	95
5.2	Tretman insulinom	96
5.2.1	Modulacija kompleksa elektron transportnog lanca i <i>cyt c</i>	96
5.2.2	Modulacija ATP sintaze i IF ₁	97
5.2.3	Modulacija UCP proteina	99
5.2.4	Heterogenost mrkih adipocita	100
6	ZAKLJUČCI	102
	LITERATURA	104

1 | Uvod

1.1 O MITOHONDRIJAMA...

MITOHONDRIJE KAO STRUKTURE SU PRVI PUT ZABILJEŽENE POLOVINOM 19. VIJEKA (Henle, 1841), ali ove organele tek nakon pedesetak godina dobijaju sve veću pažnju kao "elementarne čestice" ili bioblasti (Altmann, 1894). Benda (1898), uočavajući ih kao granule povezane u niti u spermatozoidima, daje im naziv – mitohondrije.

Sa otkrićem i primjenom elektronskog mikroskopa konačno se mogla rasvijetliti ultrastrukturalna građa mitohondrija (Palade, 1952, 1953; Sjostrand, 1953a,b). Pokazalo se da mitohondrije posjeduju dvije membrane, spoljašnju i unutrašnju membranu. Unutrašnja membrana zatvara matriks i gradi mnogobrojne nabore ili evaginacije, odnosno kriste koje se pružaju duboko u matriks. Kriste su često lamelarne, ali mogu biti i tubularne, u zavisnosti od tipa tkiva. Prostor između spoljašnje i unutrašnje mitohondrijalne membrane, intermembranski prostor, može varirati u širini. Osim toga, unutar kristi je intrakristalni prostor, koji se proteže sve do mjesta spajanja (engl. *crista junction*) sa unutrašnjom mitohondrijalnom membranom (Scheffler, 2008).

Sam matriks nije homogen, pokazuje finu granuliranost i često se mogu uočiti kristaloidne inkluzije ili elektron-guste partikule, čiji broj, u nekim slučajevima zavisi od trenutnog metaboličkog stanja posmatranog tkiva (Scheffler, 2008).

Veličina mitohondrija varira u zavisnosti od vrste tkiva, ali i od metaboličkog stanja samih ćelija. Dimenzije mitohondrija hepatocita, "reprezentativnih" mitohondrija, su 3-4 μm u dužini, a dijametra oko jedan μm . Naravno, oblik i veličina mitohondrija posmatranih elektronskim mikroskopom zavise i od ravni sječenja u odnosu na dužu osu mitohondrija (Scheffler, 2008).

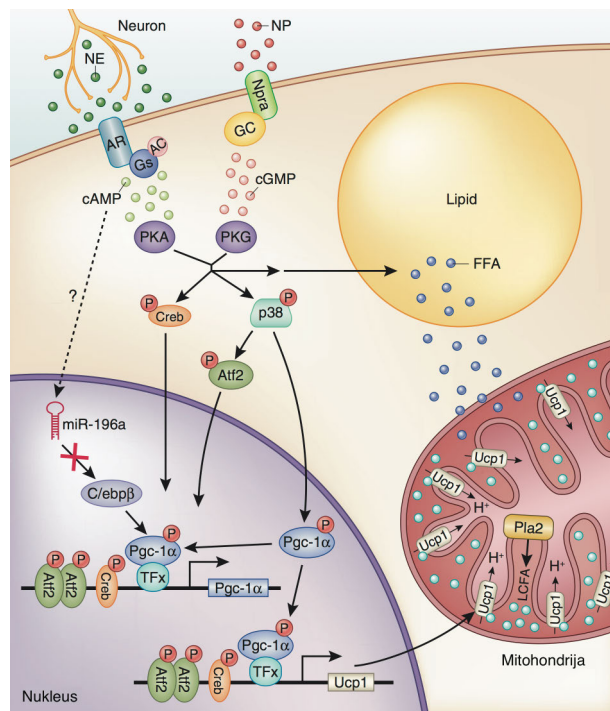
1.2 MRKI ADIPOCITI

U tkiva koja su bogata mitohondrijama spada i mrko masno tkivo (engl. *brown adipose tissue*, BAT). U BAT dominiraju mrki adipociti (engl. *brown adipocyte*, BA), koji se odlikuju veoma velikim brojem mitohondrija i malih lipidnih tijela, za razliku od bijelih adipocita. Mrki adipociti, zbog svoje osnovne funkcije – regulacije toplote i energetskeg metabolizma, veoma su zavisni od mitohondrija, koje imaju veoma dobro razvijenu unutrašnju membranu, što ukazuje na visok kapacitet respiracije.

BAT je organ koji omogućava termogenezu bez drhtanja (engl. *non-shivering thermogenesis*) (Cannon i Nedergaard, 2004), evolutivnu sposobnost koja hibernatorima, glodarima adaptiranim na hladnoću i novorođenim sisarima omogućuje da produkuju toplotu bez drhtanja. Takođe, pokazano je prisustvo ovog organa i kod čovjeka (Nedergaard i sar., 2007). BAT je pod inervacijom simpatikusa. Oslobođanje noradrenalina i njegovo vezivanje za β_3 -adrenergičke receptore (Muzzin i sar., 1991) aktivira adenilat ciklazu što dovodi do povećanja koncentracije cAMP u ćeliji (Slika 1). Povećan cAMP aktivira protein kinazu A (PKA) koja aktivira hormon senzitivnu lipazu (HSL) (Holm i sar., 1987; Shih i Taberner, 1995; Haemmerle i sar., 2002). Dolazi do hidrolize triacilglicerola i slobodne masne kiseline se oksiduju u mitohondrijama. PKA takođe dovodi do transkripcije gena neophodnih za termogenezu (Cannon i Nedergaard, 2004). Pokazano je da i natriuretski peptidi srca mogu da aktiviraju termogenezu mišjih i humanih adipocita tako što se vezuju za receptor natriuretskih peptida A (engl. *natriuretic peptide receptor A*, Npra), što dovodi do aktivacije guanilat ciklaze i povećanja koncentracije cGMP u ćeliji. cGMP aktivira protein kinazu G (PKG), koja na sličan način kao i PKA aktivira HSL i pokreće transkripciju termogenih gena (Bordicchia i sar., 2012; Collins i Bordicchia, 2013).

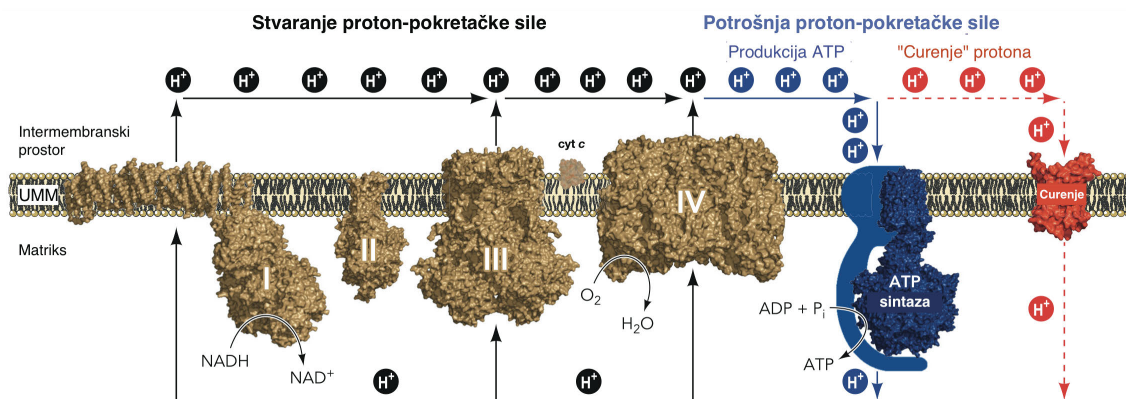
1.3 MITOHONDRIJE I BIOENERGETIKA

Za mitohondrije se često kaže da su "ćelijske elektrane" jer produkuju ATP, univerzalnu energetske valutu za sve ćelije, u procesu oksidativne fosforilacije gdje je aktivnost elektron transportnog lanca kuplovana sa produkcijom ATP (Slika 2). Tokom respiracije, protokom elektrona kroz elektron transportni lanac, protoni se ispumpavaju iz matriksa mitohondrija u intrakristalni (intermembranski) prostor čime se uspostavlja protonski gradijent između dvije strane unutrašnje mitohondrijalne membrane (pozitivna i negativna strana). Sa



Slika 1. Indukcija termogeneze. Simpatički neuroni oslobađaju katecholamine (*tamnozeleni kružići*), koji se vezuju za β -adrenergičke receptore, vodeći ka aktivaciji adenilat ciklaze (AC), što dovodi do povećanja koncentracije cAMP (*svijetlozeleni kružići*) i pojačane aktivnosti PKA. Natriuretski peptid (NP, *crveni kružići*) se vezuje za receptor natriuretskih peptida A (Npra), koji aktiviranjem guanilat ciklaze (GC) vodi ka povećanju koncentracije cGMP (*ljubičasti kružići*) i aktivaciji PKG. Aktivirane PKA i PKG koriste slične mehanizme da pokrenu transkripcionu kaskadu mrkih adipocita fosforilacijom Creb i p38 Mapk. p38 Mapk fosforiliše i aktivira Atf2 i Pgc-1 α , koji indukuju transkripciju termogenih gena, uključujući Ucp1. Pgc-1 α se vezuje za DNK putem interakcije sa Ppar- γ , Ppar- α , retinoidnih X receptora (Rxrs) i tiroidnog receptora (TFx). Osim toga, katecholamini povećavaju količinu miR-196a, što dovodi do povećane ekspresije C/ebp β , takođe vodeći aktivaciji termogenih gena. Aktivacija PKA i PKG indukuje lipolizu. Slobodne masne kiseline (FFA, *plavi kružići*) oslobođene iz lipidnih tijela se oksiduju u mitohondrijama oslobađajući toplotu. Protok protona putem Ucp1 se aktivira masnim kiselinama dugih lanaca (LCFA, *zeleni kružići*). AR, adrenergički receptor; P, fosfat; Gs, subjedinica G proteina. Adaptirano iz Harms i Seale (2013).

termodinamičkog aspekta, mjera razlike koncentracije protona sa obe strane membrane je protonski elektrohemijski gradijent, koji se sastoji od dvije komponente – hemijske razlike u koncentraciji protona (kako su u pitanju H⁺ joni, te se izražava preko ΔpH) i razlike u električnom potencijalu membrane ($\Delta \Psi_m$). U bioenergetici, protonski elektrohemijski gradijent se izražava u mV i poznat je kao proton pokretačka sila (engl. *proton motive force*, pmf ili Δp) (Nicholls i Ferguson, 2013).



Slika 2. Stvaranje i potrošnja proton pokretačke sile. Protok elektrona kroz elektron transportni lanac kuplovan je sa pumpanjem protona od strane kompleksa I, III i IV. Rezultujući elektrohemijski protonski gradijent može se iskoristiti na dva načina: 1) produkcijom ATP putem ATP sintaze; i 2) rasipanjem tog gradijenta što ne dovodi do produkcije ATP, već do termogeneze bez drhtanja i zaštite od oksidativnog oštećenja. UMM - unutrašnja membrana mitohondrija. Adaptirano iz [Divakaruni i Brand \(2011\)](#).

1.3.1 ELEKTRON TRANSPORTNI LANAC

1.3.1.1 KOMPLEKS I

Kompleks I (NADH:ubikinon oksidoreduktaza, E.C. 1.6.5.3) je jedan od važnih enzima za metabolizam ćelije. Oksiduje NADH, uglavnom iz Krebsovog ciklusa i β -oksidacije masnih kiselina, pri čemu se regeneriše NAD^+ pul u matriksu mitohondrija. Koristi dva elektrona za redukciju ubikinona (Q) u ubikinol (QH_2), snabdijevajući elektron transportni lanac elektronima za redukciju kiseonika do vode. Potencijalna energija koja se oslobađa ovom redoks reakcijom iskorištava se za prenos protona kroz unutrašnju mitohondrijalnu membranu stvarajući proton pokretačku silu ([Voet i Voet, 2004](#)).

Do sada je identifikovano 45 proteina u kompleksu I sisara (*B. taurus*), mase veće od 900 kDa, što ga čini najvećim kompleksom u elektron transportnom lancu. Sastoji se od 14 konzerviranih osnovnih (engl. *core*) subjedinica koje su dovoljne za transdukciju energije i 31 dodatne (engl. *supernumerary*) subjedinice ([Hirst, 2013](#)). Osnovne subjedinice zajedno formiraju dva domena koje imaju izgled slova L. Sedam hidrofilnih subjedinica čine redoks domen koji se pruža u matriks, a ostalih sedam, koje su hidrofobne, nalaze se u unutrašnjoj membrani mitohondrija ([Efremov i Sazanov, 2011](#); [Baradaran i sar., 2013](#); [Hirst, 2013](#)).

1.3.1.2 KOMPLEKS II

Kompleks II (sukcinat:ubikinon oksidoreduktaza, sukcinat dehidrogenaza, E.C. 1.3.5.1) je ključni membranski kompleks u Krebsovom ciklusu koji katalizuje oksidaciju sukcinata do

fumarata u mitohondrijalnom matriksu. Oksidacija sukcinata je kuplovana sa redukcijom ubikinona do ubikinola. Na taj način kompleks II povezuje Krebsov ciklus sa elektron transportnim lancem. Ovom reakcijom ne dolazi do prenosa protona tako da ne pridonosi stvaranju proton pokretačke sile (Cecchini, 2003).

Kompleks II je molekulske mase oko 124 kDa. Sastoji se od solubilnog katalitičkog heterodimera i integralnog membranskog regiona. Solubilni katalitički heterodimer se sastoji od subjedinice A sa kovalentno vezanim kofaktorom FAD (Fp subjedinica) i B (Ip subjedinica) koja sadrži 3 Fe-S klastera ([$2\text{Fe}-2\text{S}$], [$4\text{Fe}-4\text{S}$] i [$3\text{Fe}-4\text{S}$]). Integralni membranski domen čine dva hidrofobna peptida (CybL i CybS) sa jednom hem grupom između njih (Sun i sar., 2005; Maklashina i Cecchini, 2010).

1.3.1.3 KOMPLEKS III

Kompleks III (ubikinol:citohrom *c* oksidoreduktaza, E.C. 1.10.2.2) poznat je i kao bc_1 kompleks ili citohrom *c* reduktaza. Oksidacija ubikinola u ubikinon i prenos elektrona do cyt *c* je kuplovan sa prenosom četiri protona kroz unutrašnju mitohondrijalnu membranu po oksidovanom kinolu (Crofts, 2004).

Kompleks III, izolovan iz srca govečeta (*B. taurus*), sastoji se od 11 različitih polipeptida i ima molekulsku masu od 240 kDa (Schagger i sar., 1986, 1995). Posjeduje četiri redoks centra, i to: dvije hem grupe citohroma *b* (b_H i b_L), jednu hem grupu citohroma c_1 i jedan Fe-S centar unutar Rieske gvožđe sumpor proteina (Crofts, 2004).

1.3.1.4 KOMPLEKS IV

Kompleks IV (citohrom *c* oksidaza, E.C. 1.9.3.1) je posljednji kompleks elektron transportnog lanca. Oksidacijom citohroma *c* redukuje se molekulski kiseonik, krajnji akceptor elektrona, do vode. Kompleks IV je takođe protonska pumpa, koja doprinosi sa još dva protona koji se izmještaju iz matriksa, po redukujućem ekvivalentu (Kaila i sar., 2010).

Sisarski kompleks (monomer, molekulske mase 204 kDa) sadrži 13 subjedinica, gdje su najveće subjedinice (I-III) produkti mitohondrijalnog genoma. Subjedinica I vezuje hem *a* i hem a_3 , formirajući Cu_B redoks centar. Subjedinica II formira Cu_A centar. Ove subjedinice zajedno sa subjedinicom III formiraju osnovu enzima (Tsukihara i sar., 1995, 1996; Saraste, 1999; Yoshikawa, 1999). Za subjedinicu III se pretpostavlja da održava strukturni integritet kompleksa, a ostale subjedinice vjerovatno igraju ulogu u stabilizaciji, izolaciji ili formiranju kompleksa (Yoshikawa, 1999; Branden i sar., 2006).

1.3.2 ATP SINTAZA

”Svi enzimi su divni, ali ATP sintaza je jedan od najljepših, kao i jedan od najneobičnijih i važnih” enzima (Boyer, 1997), poznat i kao F_0F_1 -ATPaza ili kompleks V (E.C. 3.6.3.14). Nalazi se u unutrašnjoj membrani mitohondrija. Ovaj enzim je potrošač proton pokretačke sile, čijem formiranju doprinose kompleksi I, III i IV elektron transportnog lanca. Protonski gradijent se koristi za fosforilaciju ADP (Mitchell, 1979, 2011).

Strukturno, ATP sintaza predstavlja enzimski superkompleks molekulske mase više od 500 kDa i sastoji se od dvije subjedinice – F_1 i F_0 . F_1 , molekulske mase oko 380 kDa, uronjen je u matriks i predstavlja hidrofilni dio ATP sintaze. Odvajanjem od membranskog domena ATP sintaze, ponaša se kao ATP vodeći motor, rotacijom unutrašnjih subjedinica dolazi do hidrolize ATP, zato je i poznat kao F_1 -ATPaza. Druga subjedinica ATP sintaze – F_0 , mase oko 120 kDa, uronjena je u membranu i njenom rotacijom dolazi do translokacije protona uslijed razlike u protonskom elektrohemijemskom gradijentu (Yoshida i sar., 2001; Suzuki i sar., 2002; Okuno i sar., 2011).

F_1 se sastoji od $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ subjedinica. Tri α i tri β subjedinice formiraju heksamerni prsten u kome su subjedinice poređane naizmjenično. Osovinu rotora čini γ subjedinica, koja se nalazi u šupljini $\alpha_3\beta_3$ prstena. Subjedinica ε vezuje se za istureni dio γ subjedinice, osiguravajući na taj način vezu između F_1 i F_0 (Menz i sar., 2001; Walker, 2013).

Bakterijski F_0 sastoji se od ab_2c_{10-15} subjedinica, dok mitohondrijalnu F_0 čine i $d, e, f, g, OSCP, F6$ i $A6L$ subjedinice. Subjedinice c formiraju oligomerni rotirajući prsten. Broj c subjedinica varira među vrstama, npr. u mitohondrijama sisara je 8 (Watt i sar., 2010), kod kvasaca – 10 (Stock i sar., 1999), dok je najveći broj c subjedinica – 15, otkriven kod jedne vrste algi (Pogoryelov i sar., 2005). Subjedinica a je lateralno prikačena za c prsten omogućavajući rotaciju (Ono i sar., 2004). Kod sisara, stator je sačinjen od četiri subjedinice – $OSCE, b, d$ i $F6$ (Collinson i sar., 1994). On se vezuje za a subjedinicu i c prsten, s jedne strane, i za δ subjedinicu, s druge strane, tako povezujući F_0 i F_1 domene (Motz i sar., 2004; Walker, 2013).

Mitohondrije mrkih adipocita posjeduju nizak kapacitet za sintezu ATP (Houstek i Drahot, 1977), gdje je stehiometrijski odnos između ATP sintaze i respiratornog lanca (ATP sintaza/COX) 5-11 puta niži u odnosu na mitohondrije drugih tkiva (Houstek i sar., 1991). Subjedinica c F_0 domena je produkt gena $P1$ i $P2$, gdje je odnos $P1/P2$ transkriptata veći u tkivima sa većom aktivnošću ATP sintaze. $P1$ gen odgovara na razne fiziološke stimuluse, npr. nakon izlaganja hladnoći (4 °C) u mrkim adipocitima pacova dolazi do nagle ekspresije unutar 24 sata, pa potom opada sve dok ne dostigne 40% nivoa ekspresije kontrolnih životinja. Ovaj

efekat je bio primijećen samo u BAT, dok u srcu ili jetri nije bilo promjena (Andersson i sar., 1997). Literaturni podaci su pokazali da je količina ATP sintaze u mrkim adipocitima regulisana kako na transkripcionom, tako i na proteinskom nivou pojedinih subjedinica. Na primjer, Kramarova i sar. (2008) su pokazali, na eksperimentima sa transgenim UCP₁ miševima gdje je *P₁* gen kod kontrolom UCP₁ promotora, da su te životinje imale povećan nivo ATP sintaze nakon izlaganja hladnoći. Ovi eksperimenti pokazuju da je ograničena dostupnost subjedinica ATP sintaze uzrok niske količine ATP sintaze u mitohondrijama mrkih adipocita.

Na ultrastrukturnom nivou, metodom negativnog bojenja, ATP sintaza se uočava kao globularna struktura – "elementarna čestica", lokalizovana na matriksnoj strani unutrašnje membrane mitohondrija (Fernandez Moran i sar., 1964; Kagawa i Racker, 1966). A intrigantan podatak je da u vrijeme otkrića "elementarne čestice", Lindberg i sar. (1967) nisu uočili takvu strukturu u mitohondrijama mrkih adipocita.

1.3.3 INHIBITORNI FAKTOR 1 (IF₁)

ATP sintaza ima mogućnost reverzne rotacije, pri čemu dolazi do hidrolize ATP u uslovima kada je narušena aktivnost elektron transportnog lanca, pri povećanom "curenju" protona ili u uslovima hipoksije (Nicholls, 1974; Weber i Senior, 2000).

IF₁, inhibitorni faktor 1 ATPaze, inhibira ATPaznu aktivnost spriječavajući hidrolizu ATP. IF₁ je molekulske mase 10 kDa i uglavnom je lokalizovan unutar matriksa mitohondrija (Campanella i sar., 2009). Pri kiselom pH (oko 6.7), formira se dimer koji je ujedno i aktivna forma IF₁, dok je pri baznom pH (oko 8.0) u vidu tetramera i ne interaguje sa ATP sintazom (Galante i sar., 1981; Cabezon i sar., 2000; Aggeler i sar., 2002; Long i sar., 2015). Kristalna struktura kompleksa ATP sintaze i IF₁ pokazuje da se IF₁ insertuje između α i β subjedinica F₁ domena (Cabezon i sar., 2003). Inhibicija nije potpuna i prije svega zavisi od odnosa IF₁/ATP sintaze, a nema efekat na ATP sintaznu aktivnost (Campanella i sar., 2009).

Pokazano je da IF₁ spriječava remodeliranje unutrašnje mitohondrijalne membrane koje bi dovelo do redistribucije *cyt c* i do apoptoze (Campanella i sar., 2009; Faccenda i sar., 2013). *In vitro* eksperimenti sa ćelijama osteosarkoma su pokazali da interakcija IF₁, bilo direktno, povećavanjem katalitičke aktivnosti ATP sintaze, bilo indirektno, poboljšanjem strukture mitohondrijalnih kristi (interakcijom sa ATP dimerima), poboljšava bioenergetski kapacitet pod normoksičnim uslovima (Barbato i sar., 2015). IF₁, podsticanjem pada $\Delta\Psi_m$, dovodi do aktivacije PINK-PARK2 zavisne mitofagije, što je i potvrđeno odsustvom mitofagije u IF₁-KO ćelijama (Lefebvre i sar., 2013). Međutim, još nije potpuno razjašnjena uloga IF₁, jer IF₁-KO

miševi nisu pokazali nikakvu fenotipsku promjenu u mitohondrijama (Nakamura i sar., 2013).

Proteomska analiza BAT miševa izloženih hladnoći pokazala je dvostruko povećanje IF₁, koja inhibira ATPaznu aktivnost ATP sintaze u mitohondrijama mrkih adipocita u uslovima kada je pojačano rasipanje protonskog gradijenta dekupljujućim proteinima (Forner i sar., 2009).

1.3.4 UCP PROTEINI

1.3.4.1 UCP₁

Sposobnost BAT da produkuje toplotu omogućena je zahvaljujući prisustvu dekupljujućeg proteina ₁ (engl. *uncoupling protein 1*, UCP₁) koji se nalazi u unutrašnjoj membrani mitohondrija (Heaton i sar., 1978; Aquila i sar., 1985; Bouillaud i sar., 1986). Sam UCP₁ rasipa protonski gradijent nastao radom elektron transportnog lanca i na taj način pretvara energiju oksidacije supstrata u toplotu (Nicholls i Locke, 1984). UCP₁ se aktivira masnim kiselinama dugih lanaca dobijenih lipolizom lipidnih tijela nakon adrenergičke aktivacije BAT (Cannon i Nedergaard, 2004). Osim noradrenalina, sintezu UCP₁ stimulišu cAMP, tiroidni hormoni i retinoidi (Cannon i Nedergaard, 1985; Silva i Rabelo, 1997; Cannon i Nedergaard, 2004).

UCP₁, molekulske mase 32 kDa, pripada genskoj porodici mitohondrijalnih proteinskih anjonskih nosača (engl. *mitochondrial anion carrier proteins*, MACP) (Jezek i Garlid, 1998). Kako se UCP₁ aktivira masnim kiselinama, kao i jasan mehanizam funkcionisanja ovog proteina ostaje spekulativan (Jezek i Garlid, 1998). Osim toga, pokazano je da se UCP₁ inhibira purinskim nukleotidima (Krauss i sar., 2005; Echantay, 2007; Woyda-Ploszczyca i Jarmuszkiewicz, 2014) ali mehanizam na koji način masne kiseline prevazilaze ovu inhibiciju ostaje nejasan (Shabalina i sar., 2004; Nicholls, 2006; Klingenberg, 2010; Fedorenko i sar., 2012). Neki autori smatraju da sam UCP₁ ne povećava respiratorni kapacitet ćelija u bazalnim uslovima (Shabalina i sar., 2010; Jastroch i sar., 2012).

Predloženo je nekoliko modela funkcionisanja UCP₁: (1) UCP₁ funkcioniše kao H⁺ kanal, tj. uniporter koji se aktivira alosternim vezivanjem masnih kiselina (Rial i Gonzalez-Barroso, 2001; Cannon i Nedergaard, 2004); (2) *buffering* model ili kofaktorna teorija, gdje UCP₁ funkcioniše kao H⁺ kanal, a masne kiseline se vezuju za odgovarajuće mjesto unutar kanala i svojim karboksilnim grupama omogućavaju prenos protona (Winkler i Klingenberg, 1994; Klingenberg i Huang, 1999); (3) model cikliranja masnih kiselina (engl. *fatty acid cycling model*), UCP₁ funkcioniše kao nosač anjona masnih kiselina koji prenose H⁺ indirektno: UCP₁ prenosi anjon masnih kiselina ka spoljašnjoj strani unutrašnje

mitohondrijalne membrane gdje vezuje H^+ , i u protoniranoj formi, flip flop mehanizmom, vraća se ka unutrašnjoj strani membrane i oslobađa H^+ u matriks mitohondrija (Andreyev i sar., 1989; Garlid i sar., 1998; Goglia i Skulachev, 2003); (4) LCFA (engl. *long chain fatty acid*, masne kiseline dugih lanaca) *shuttling* model gdje UCP₁ funkcionira kao simporter anjona masnih kiselina i H^+ , ali ne dolazi do disocijacije anjona masnih kiselina i UCP₁ zbog interakcije njihovih hidrofobnih krajeva, već nastavlja da "funkcionira" kao H^+ nosač (Fedorenko i sar., 2012).

1.3.4.2 UCP₂ i UCP₃

Dekuplujući proteini 2 i 3 (UCP₂ i UCP₃), homolozi UCP₁ proteina, identifikovani su reverznim kloniranjem (Boss i sar., 1997; Fleury i sar., 1997; Vidal-Puig i sar., 1997). Imaju sličnu aminokiselinsku sekvencu kao i UCP₁, tj. UCP₂ pokazuje 59% sličnosti sa UCP₁, a UCP₃ 57% sličnosti sa UCP₁, a njihova međusobna sličnost iznosi 73% (Krauss i sar., 2005). Takođe pripadaju genskoj porodici mitohondrijalnih proteinskih anjonskih nosača (Krauss i sar., 2005). Pored BAT (Rodriguez i sar., 2002; Hurov i sar., 2007), UCP₂ je prisutan i u skeletnim mišićima (Simoneau i sar., 1998; Cadenas i sar., 1999; Schrauwen i sar., 1999), slezini (Horvath i sar., 2002), srcu (Boehm i sar., 2001; Murray i sar., 2004; Bo i sar., 2008), bubrezima (Qiu i sar., 2012; Jiang i sar., 2013), Langerhansovim ostrvcima pankreasa (Joseph i sar., 2004; Diao i sar., 2008), makrofagima (Arsenijevic i sar., 2000; Wang i sar., 2009) i WAT (engl. *white adipose tissue*, bijelo masno tkivo) (Harrold i sar., 2000; Rippe i sar., 2000). UCP₃ uglavnom je prisutan u skeletnim mišićima (Boss i sar., 1997; Krook i sar., 1998), srcu (Vettor i sar., 2002; Murray i sar., 2004) i BAT (Gong i sar., 1997; Samec i sar., 1998; Krauss i sar., 2005).

Kako su Matthias i sar. (2000) pokazali da ekskluzivna uloga termogeneze u BAT pripada UCP₁ proteinu, postavljalo se pitanje funkcije UCP₂ i UCP₃ proteina. Smatra se da je jedna od funkcija UCP₂ i UCP₃ proteina *mild uncoupling* što omogućava brži protok elektrona kroz elektron transportni lanac, te smanjivanje membranskog potencijala dovodi do smanjenja produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Brand i Esteves, 2005; Fisler i Warden, 2006). Pokazano je da UCP₂-KO miševi imaju povećanu produkciju ROS u makrofagima (Arsenijevic i sar., 2000), Langerhansovim ostrvcima pankreasa (Krauss i sar., 2003), a UCP₃-KO miševi povećan nivo ROS u skeletnim mišićima (Vidal-Puig i sar., 2000), što ukazuje da ti dekuplujući proteini imaju zaštitnu ulogu od ROS.

Utvrđeno je da je genska ekspresija UCP₂ i UCP₃ povećana tokom gladovanja (Cadenas i sar., 1999), kao i da UCP₂- ili UCP₃-KO miševi nisu gojazni (Arsenijevic i sar., 2000; Gong

i sar., 2000), što može ukazati da ne doprinose termogenezi. S druge strane, studije sa prekomjernom ekspresijom UCP_{2/3} su pokazale da su ti miševi mršaviji u odnosu na divlji tip (Fuller i sar., 2000; Horvath i sar., 2003). Miševi sa prekomjernom ekspresijom UCP₃ u skeletnim mišićima su bili mršaviji bez obzira na povećani unos hrane (Clapham i sar., 2000). Neki autori smatraju da primjećeno dekuplovanje elektron transportnog lanca i ATP produkcije u navedenim studijama prekomjerne genske ekspresije UCP₂ i UCP₃ zapravo artefakt i da ne izražava pravu funkciju i fiziološku ulogu ovih proteina (Brand i Esteves, 2005; Esteves i Brand, 2005).

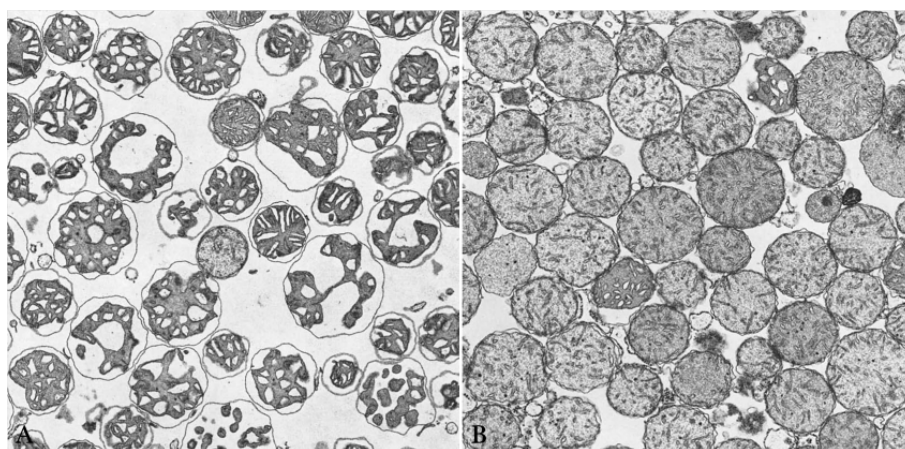
UCP₂ igra značajnu ulogu u regulaciji sekrecije insulina (Brand i Esteves, 2005; Krauss i sar., 2005; Mattiasson i Sullivan, 2006). Smatra se da UCP₃ ima ulogu u eksportu masnih kiselina van mitohondrija (Himms-Hagen i Harper, 2001). Ova tvrdnja je u saglasnosti sa studijama u kojima je pokazana korelacija nivoa UCP₃ sa povećanom oksidacijom masnih kiselina u slučaju njihovog visokog unosa (dijeta bogata mastima, gladovanje) (Gong i sar., 1999; Boss i sar., 2000; Krauss i sar., 2003; Schrauwen i Hesselink, 2004; Brand i Esteves, 2005). U skeletnim mišićima dolazi do povećane ekspresije UCP₃ kada su pacovi na dijeti bogatoj triacilglicerolima dugih lanaca, što nije slučaj sa triacilglicerolima srednjih lanaca jer se na drugačiji način oksiduju (Schrauwen i sar., 2003). Eksportom masnih kiselina iz mitohondrija, UCP₃ sprječava akumulaciju lipida i oštećenje mitohondrija (Fisler i Warden, 2006).

1.4 ENERGETSKA STANJA IZOLOVANIH MITOHONDRIJA I NJIHOV IZGLED

Kako je kiseonik krajni akceptor elektrona, moguća je primjena Clark kiseonične elektrode u istraživanjima na izolovanim mitohondrijama ili permeabilizovanim ćelijama i mišićnim vlaknima *in vitro* (Pesta i Gnaiger, 2012; Silva i Oliveira, 2012). Chance i Williams (1955) su uveli konvenciju redosljeda dodavanja agenasa tokom mjerenja respiracije mitohondrija i utvdili sljedeća respiratorna stanja: a) *stanje 1* – mitohondrije su same u medijumu, prisutan samo neorganski fosfat; b) *stanje 2* – dodat ADP u medijum, respiracija je niska zbog nedostatka supstrata; c) *stanje 3* – ADP i supstrati su prisutni u medijumu, dolazi do brze respiracije; d) *stanje 4* – ceo ADP je konvertovan u ATP, usporava se respiracija; i e) *stanje 5* – uslovi anoksije. Nicholls i Ferguson (2013) su iz praktičnih razloga izmijenili definiciju stanja 2 (u prisustvu supstrata) i stanja 3 (supstrat i ADP).

Hackenbrock (1966, 1968) je pokazao direktnu vezu između odgovarajućih respiratornih stanja i mitohondrijalne ultrastrukture, gdje aktivacijom respiracije ortodoksne mitohondrije

postaju kondenzovane sa povećanim intrakristalnim prostorom (Slika 3). Ortodoksne mitohondrije se odlikuju sljedećim karakteristikama: unutrašnja membrana je pravilno savijena u organizovane kriste; matriks se odlikuje povećanom zapreminom i manjom gustinom; a intrakristalni i intermembranski prostor je volumenski smanjen. Kondenzovane mitohondrije se odlikuju nepravilnom savijenom unutrašnjom membranom; matriks ima smanjenu zapreminu i povećanu gustinu; a intrakristalni i intermembranski prostor je volumenski uvećan (Hackenbrock, 1968).

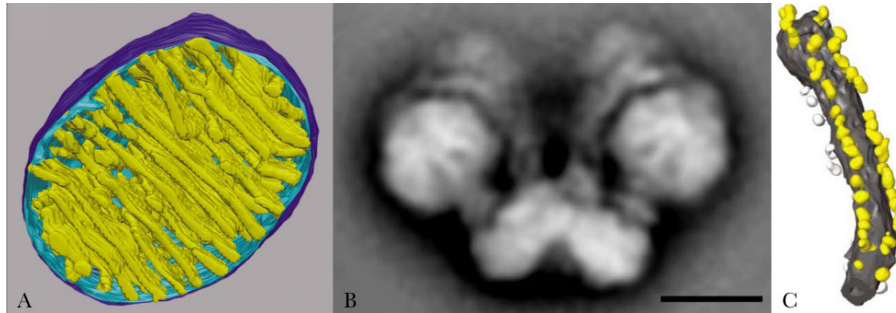


Slika 3. Transmisiona elektronska mikroskopija izolovanih mitohondrija iz jetre pacova. (A) Kondenzovane mitohondrije. (B) Ortodoksne mitohondrije. Uveličanje: x27.000. Adaptirano iz Hackenbrock (1968).

1.5 UNUTRAŠNJA ARHITEKTURA MITOHONDRIJA

Dobro poznata dvodimenzionalna slika mitohondrija prikazuje relativno otvoren prostor između kristi i intermembranskog prostora mitohondrija. Međutim, posmatranje serijskih presjeka na nivou elektronske mikroskopije visoke rezolucije i rekonstrukcija trodimenzionalne strukture mitohondrija kompjuterskom tomografijom dovelo je u pitanje otvorenost kristi ka intermembranskom prostoru (Slika 4A). Pokazano je da je unutrašnja membrana mitohondrija sklona remodeliranju u zavisnosti od uslova. Scorrano i sar. (2002) su pokazali povezanost remodeliranja unutrašnje membrane sa oslobađanjem cyt c u apoptozi. U istom tom ćelijskom procesu, dolazi i do fragmentacije unutrašnje mitohondrijalne membrane (Sun i sar., 2007).

Na osnovu svega navedenog, postalo je jasno da kriste nisu puke invaginacije unutrašnje mitohondrijalne membrane, već da su to jasni mikrokompartimenti, te je unutrašnja



Slika 4. Unutrašnja arhitektura mitohondrija. (A) Kompjuterski model dobijen trodimenzionalnom tomografijom mitohondrija iz cerebeluma pilića, gdje se uočavaju kriste (žuto), unutrašnja granična membrana (svijetloplavo) i spoljašnja mitohondrijalna membrana (tamnoplavo). Adaptirano iz Frey i Mannella (2000). (B) Negativno obojen dimer ATP sintaze izolovan iz *Polytomella* spp. Bar: 10 nm. Adaptirano iz Dudkina i sar. (2010). (C) Tomografska rekonstrukcija niza dimera ATP sintaze iz tubule krista mitohondrija iz jetre pacova. Dužina tubule: 280 nm. Adaptirano iz Strauss i sar. (2008).

mitohondrijalna membrana podijeljena na dva poddomena - unutrašnja granična membrana (engl. *inner boundary membrane*, IBM) i membrana kristi (engl. *cristae membrane*, CM). Dakle, IBM je u bliskom kontaktu sa spoljašnjom mitohondrijalnom membranom, i zajedno zatvaraju mitohondrij, što se na nivou TEM (transmisioni elektronski mikroskop) uočava kao dvije membrane. CM su invaginacije IBM koje prodiru u matriksni prostor (Zick i sar., 2009). Kriste su povezane sa IBM suženim strukturama u obliku tubula ili proreza, nazvanim kristalni spojevi (engl. *crista junction*, CJ) koje su uočene elektronskom tomografijom mitohondrija (Mannella i sar., 1994; Perkins i sar., 1997, 1998; Nicastro i sar., 2000; Frey i sar., 2002; Rabl i sar., 2009). Dijametar kristalnih spojeva je svega 12 do 40 nm, što implicira da ti spojevi formiraju barijere za transport proteina i metabolita između intrakristalnog i intermembranskog prostora, ali i između CM i IBM (Rabl i sar., 2009). Smatra se da takva barijera ograničava unos ADP u intrakristalni prostor (Mannella, 2008). Remodeliranje unutrašnje membrane uključuje i petostruko proširivanje kristalnih spojeva, što može da dovede do transporta *cyt c* između intrakristalnog i intermembranskog prostora (Scorrano i sar., 2002; Frezza i sar., 2006). Topologija unutrašnje mitohondrijalne membrane, prema tome, može imati efekat na aktivnost mitohondrija uticajem na kinetiku difuzije metabolita i proteina između dva navedena kompartmenta (Mannella, 2008), ako se uzme u obzir da su proteini uključeni u oksidativnu fosforilaciju lokalizovani u kristama (Vogel i sar., 2006; Benard i Rossignol, 2008).

1.5.1 UTICAJ ATP SINTAZE NA ARHITEKTURU KRISTI

ATP sintaza ima direktan efekat na topologiju unutrašnje mitohondrijalne membrane. Tretmanom blagim deterdžentima i nativnom gel elektroforezom srca miša (Wittig i sar., 2006)

i govečeta (Schagger i Pfeiffer, 2000) utvrđeno je da se ATP sintaza javlja i u vidu dimera (Slika 4B). Veliki nizovi dimera ATP sintaze su prisutni u unutrašnjoj membrani mitohondrija (Allen i sar., 1989; Buzhynskyy i sar., 2007; Strauss i sar., 2008; Davies i sar., 2012), čak i do 80 dimera u nizu (Slika 4C) dovodeći do pozitivnog zakrivljenja membrane sa dijametrom od oko 17 nm (Strauss i sar., 2008). Fc₁ (engl. *formation of CJ protein 1*) protein, koji je koncentrisan u samoj invaginaciji IBM, dovodi do negativnog zakrivljenja membrane prilikom formiranja CJ (Rabl i sar., 2009; Korner i sar., 2012). Smatra se da ti nizovi ATP dimera dovode do savijanja membrane što dalje vodi formiranju kristi. Zajedničkom lokalizacijom respiratornih kompleksa u vidu superkompleksa i ATP sintaze sa membranom kristi dolazi do stvaranja mikrosredine povoljne za reakcije prenosa elektrona i protona (Allen, 1995; Bornhovd i sar., 2006; Strauss i sar., 2008; Zick i sar., 2009; Davies i sar., 2012). Kod kvasaca je pokazano da delecija subjedinice *e* ili *g* ATP sintaze dovodi do nastanka abnormalnih mitohondrija čije unutrašnje membrane poprimaju slojevit oblik nalik na luk umjesto kristi (Paumard i sar., 2002). Rekonstitucijom ili prekomjernom ekspresijom IF₁ dolazi do povećanja odnosa ATP dimera u odnosu na ATP monomer, što ukazuje da IF₁ ima ulogu u uspostavljanju ili stabilizaciji ATP dimera (Garcia i sar., 2006). Pretpostavlja se da mitohondrijalne kriste služe kao neki vid zamke za protone, sa ATP sintazama na vrhovima tih kristi što omogućava efikasnu ATP produkciju (Strauss i sar., 2008). Kompjuterskim simulacijama je utvrđeno da je u regionima kristi u blizini dimera ATP sintaze veća koncentracija protona što dovodi do povećanja lokalne razlike u pH vrijednosti za oko 0.5 jedinica (Strauss i sar., 2008), što opet doprinosi stvaranju proton pokretačke sile.

1.5.2 RESPIRATORNI SUPERKOMPLEKSI

Nativna gel elektroforeza (engl. *blue native polyacrylamide gel electrophoresis*, BN-PAGE), nakon tretmana blagim deterdžentima radi izolacije proteina mitohondrijalnih membrana, pokazala je da su kompleksi I, III i IV češće u formi superkompleksa, a naročito kompleks I koji gotovo da je prisutan samo u superkompleksima (Schagger i Pfeiffer, 2000). Najčešći superkompleksi koji su utvrđeni jesu kompleks I/III_n (Dudkina i sar., 2005; Lenaz i sar., 2010), kompleks I/III_n/IV_n (Stroh i sar., 2004; Dudkina i sar., 2011) i kompleks III_n/IV_n (Berry i Trumpower, 1985; Zhang i sar., 2005). Za razliku od ostalih kompleksa elektron transportnog lanca, kompleks II je prisutan uglavnom u slobodnoj formi, a samo mali udio je vezan za superkompleks I/III/IV (Eubel i sar., 2003; Acin-Perez i sar., 2008; Muster i sar., 2010; Winge, 2012).

Lapuente-Brun i sar. (2013) su ustanovili da je dinamičko sklapanje superkompleksa mehanizam kojim se ćelija jetre prilagođava na različite izvore ugljenika i tako modulira elektron transportni lanac zadovoljavajući trenutne potrebe. Kako je odnos NADH/FAD elektrona viši kada je glukoza primarni supstrat respiracije (5), a niži u slučaju oksidacije masnih kiselina (palmitat – oko 2) (Speijer, 2011), pokazano je da ćelija ima sposobnost selektivnog kanalisanja elektrona kroz komplekse (Lapuente-Brun i sar., 2013). Sklapanje i stabilnost respiratornih superkompleksa zavisi i od oblika samih kristi, što implicira da je sklapanje respiratornih superkompleksa veza između mitohondrijalne strukture i funkcije (Cogliati i sar., 2013).

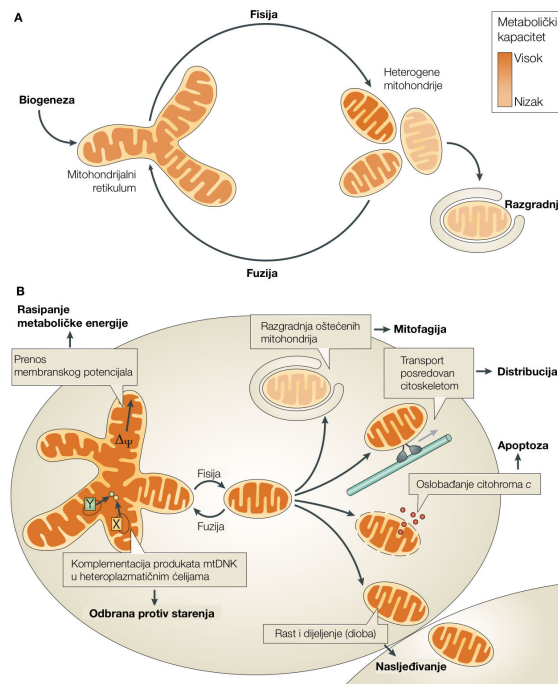
1.6 REMODELIRANJE MITOHONDRIJA

Davno je primjećeno da se mitohondrije stalno mijenjaju, "da se te granule međusobno spajaju u štapiće ili lance, te se izdužuju u niti koje se spajaju sa drugim nitima stvarajući mrežu, a zauzvrat mogu da se opet razlože na niti, štapiće, petlje i prstene" (Lewis i Lewis, 1914), a 80-ih godina prošlog vijeka pokazano je da su mitohondrije visoko dinamičke organele koje mogu da formiraju intracelularni retikulum (Bereiter-Hahn, 1990).

Mitohondrije stalno ulaze u igru spajanja procesom fuzije i razdvajanja procesom fisije (Slika 5). Veći mitohondrijalni retikulum je veoma značajan u metabolički aktivnim ćelijama gdje doprinosi npr. prenosu energije (Skulachev, 1990). Nasuprot tome, u mirujućim ćelijama se mitohondrije često uočavaju kao brojne morfološki i funkciono definisane jedinice u vidu sfera ili štapića (Collins i sar., 2002).

Mitohondrijalna dinamika omogućava mitohondrijama da se povezuju sa endoplazminim retikulumom (ER) u visokospecijalizovanim regionima membrane (engl. *mitochondria associated membrane*, MAM), koja prije svega omogućava prenos Ca^{2+} iz ER u mitohondrije. MAM omogućava lokalizovano povećanje koncentracije Ca^{2+} , neophodno za Ca^{2+} signalizaciju (Patergnani i sar., 2011). Ova veza između mitohondrija i ER je važna za homeostazu Ca^{2+} i njegov metabolizam. Blisko povezivanje ovih organela omogućava povećanje mitohondrijalne koncentracije Ca^{2+} što može voditi apoptozi (Szabadkai i sar., 2004), ili u fiziološkim granicama, povećati bioenergetski kapacitet aktivacijom piruvat dehidrogenaze (Denton, 2009). Ova veza je omogućena zahvaljujući prisustvu Mfn2 (engl. *mitofusin-2*), jednog igrača mitohondrijalne fuzije (de Brito i Scorrano, 2008; Yang i Frohman, 2012). Osim toga, ER sa mitohondrijama formiraju mikrodomene koje omogućavaju fisiju mitohondrija (Yang i Frohman, 2012).

Da bi se ispunile energetske potrebe ćelije, broj mitohondrija je regulisan samom



Slika 5. Biološke funkcije mitohondrijalnog remodeliranja. (A) Životni ciklus mitohondrija počinje rastom i diobom postojećih organela (biogeneza) i završava se degradacijom oštećenih ili nepotrebnih organela mitofagijom. Između ta dva procesa, mitohondrije ulaze u stalan ciklus fuzije i fisije što omogućava ćeliji da balansira između pojedinih mitohondrija i mitohondrijalnog retikuluma, u zavisnosti od datih fizioloških uslova. (B) Fuzija i fisija mitohondrija su važne za mnoge biološke funkcije. Dioba je neophodna za nasljeđivanje i preraspodjelu organela tokom ćelijske diobe, za oslobađanje proapoptotskih faktora iz intermembranskog prostora, za unutarćelijsku distribuciju ili za razgradnju oštećenih organela mitofagijom. Fuzionisani mitohondrijalni retikulum je važan za rasipanje metaboličke energije prenosom membranskog potencijala duž mitohondrijalnih filamenata, i za komplementaciju genskih produkata mtDNK u heteroplazmatičnim ćelijama izbjegavajući pad respiratornog kapaciteta tokom starenja (X i Y se odnose na alele različitih mitohondrijalnih gena). Adaptirano iz [Westermann \(2010\)](#).

mitohondrijalnom biogenezom. Taj proces biogeneze je regulisan od strane PGC-1 α (engl. *peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α*), što je važno za ćeliju i mitohondrijalnu dinamiku jer je transkripcioni koaktivator Mfn2 ([Zorzano, 2009](#); [Ryan i sar., 2013](#)).

Mitohondrije posjeduju program kontrole kvaliteta, odnosno mitofagiju. Mitofagijom, tj. autofagocitozom se ćelija "riješava" oštećenih, depolarizovanih mitohondrija. Procesom fisije izoluju se depolarizovane mitohondrije, a istovremenim smanjenjem medijatora fuzije spriječava se njihovo spajanje sa drugim mitohondrijama ([Zhang i Ney, 2010](#); [Youle i Narendra, 2011](#); [Kubli i Gustafsson, 2012](#); [Zhang, 2013](#)).

Fisija je proces formiranja manjih i jasno izdvojenih mitohondrija, što im omogućava produkciju ROS ([Yu i sar., 2008](#); [Jheng i sar., 2012](#)), eliminaciju mitohondrija mitofagijom i ćelijsku proliferaciju ([Marsboom i sar., 2012](#); [Salabei i Hill, 2013](#)). Fuzija, s druge strane, dovodi do formiranja mitohondrijalnog retikuluma koji omogućava komunikaciju sa ER, ali i difuziju

matriksnog sadržaja među mitohondrijama "razblažujući" stepen oštećenja mitohondrijalne DNK (Santel i sar., 2003; Archer, 2013).

Procesi mitohondrijalnog remodeliranja su regulisani uz pomoć visokokonzervisanih guanin trifosfataza (GTPaze) (Youle i van der Bliek, 2012; Ishihara i sar., 2013). Fisija je posredovana uz pomoć Drp1 (engl. *dynamamin related protein 1*) (Chen i sar., 2003; Cribbs i Strack, 2009), citoplazmatskog proteina koji aktivacijom formira prstenastu strukturu koja se sužava i dijeli mitohondriju (Lee i sar., 2004; Zhu i sar., 2004). Za tu funkciju, uključeni su i drugi proteini kao što su Fis1 (engl. *mitochondrial fission 1 protein*) (Lee i sar., 2004), Mff (engl. *mitochondrial fission factor*) (Otera i sar., 2010), i Mef (engl. *mitochondrial elongation factor*) (Zhao i sar., 2011). Kristalografska analiza Dnm1 oligomera (analoga Drp1 kod kvasaca) pokazala je da je dijametar Dnm1 heliksa 110-130 nm (Chappie i sar., 2011; Faelber i sar., 2011; Ford i sar., 2011), što je značajno manje od dijametra mitohondrija. ER uskače u pomoć tako što svojim tubulama obavija mitohondriju i vrši suženje na tom mjestu (Friedman i sar., 2011), smanjujući dijametar (138 i 146 nm) na vrijednosti približne dijametru Dnm1/Drp1 heliksa omogućavajući oligomerizaciju Dnm1 proteina i time uspješnu fisiju mitohondrija (Labrousse i sar., 1999; Legesse-Miller i sar., 2003; Ingerman i sar., 2005; Mears i sar., 2011). Aktivnost Drp1 proteina regulisana je fosforilacijom Ser ostataka, i to fosforilacijom Ser600 i Ser616 dolazi do povećanja njene aktivnosti, a fosforilacijom Ser637 do smanjenja aktivnosti Drp1 (Taguchi i sar., 2007; Han i sar., 2008; Marsboom i sar., 2012). Postoje i drugi vidovi regulacije aktivnosti Drp1 i to ubikvitinacijom (Yonashiro i sar., 2006; Wang i sar., 2011) i sumoilacijom/desumoilacijom (Braschi i sar., 2009; Figueroa-Romero i sar., 2009; Zunino i sar., 2009).

Glavni igrači fuzije su Mfn1 (engl. *mitofusin-1*) i Mfn2, izoforme koje se nalaze u spoljašnjoj membrani mitohondrija, i Opa1 (engl. *optic atrophy protein 1*) prisutan u unutrašnjoj membrani mitohondrija (Cipolat i sar., 2004). Homo- odnosno heterodimernom interakcijom Mfn1 i/ili Mfn2 dolazi do inicijacije fuzije spoljašnjih membrana susjednih mitohondrija (Rojo i sar., 2002; Chen i sar., 2003). Opa1 posreduje u fuzionisanju unutrašnjih membrana mitohondrija (Song i sar., 2007; Westermann, 2010). Prvo dolazi do spajanja spoljašnjih membrana mitohondrija posredstvom Mfn1 i Mfn2, i potom do spajanja unutrašnjih membrana mitohondrija posredstvom Opa1. Međutim, brojne studije su pokazale da ta dva procesa mogu da funkcionišu nezavisno jedan od drugog, odnosno da u nekim slučajevima ne dolazi do spajanja unutrašnjih membrana mitohondrija (Meeusen i sar., 2004; Malka i sar., 2005; Meeusen i sar., 2006). Osim toga, pokazano je da je Mfn2 prisutan i u membrani ER,

omogućavajući bliski kontakt između ER i mitohondrija (de Brito i Scorrano, 2008). Fuzija mitohondrija je prije svega regulisana fosforilacijom i ubikvitinacijom mitofuzina (Cohen i sar., 2008; Gegg i sar., 2010; Poole i sar., 2010; Tanaka i sar., 2010; Leboucher i sar., 2012; Anton i sar., 2013).

Fibroblasti embriona miševa, u kojima odsustvuje Mfn1 ili Mfn2, mogu da održavaju mitohondrijalnu DNK, ali je primjećen gubitak mitohondrijalnog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) u pojedinim mitohondrijalnim populacijama (Chen i sar., 2003). Čelije, u kojima odsustvuje fuzija mitohondrija, imaju smanjen respiratorni kapacitet (Chen i sar., 2005). U eksperimentu sa dvjema respiratorno-deficijentnim HeLa ćelijama sa mutacijom u različitim mitohondrijalnim genima za tRNK, pokazalo se da njihovi hibridi uspostavljaju respiraciju nekoliko dana poslije fuzije njihovih mitohondrija (Ono i sar., 2001). Slični rezultati su dobijeni i u eksperimentu sa miševima (Nakada i sar., 2001). Ovi rezultati ukazuju da fuzija mitohondrija i razmjena mitohondrijalne DNK igraju važnu ulogu u održanju respiratornog kapaciteta sisarskih ćelija. Osim toga, fuzijom se formira mitohondrijalni retikulum koji se može posmatrati kao električni kuplovani sistem (Amchenkova i sar., 1988; De Giorgi i sar., 2000), tj. mitohondrijalni retikulum funkcioniše kao sistem intracelularnih kablova koje prenose energiju (Skulachev, 1990). Po toj hipotezi, kompleksi elektron transportnog lanca proizvode $\Delta\Psi_m$ i to u dijelovima ćelije sa većom koncentracijom O_2 , i taj $\Delta\Psi_m$ se prenosi putem mitohondrijalnih filamenata do udaljenih dijelova ćelije, gdje se može iskoristiti za aktivnost ATP sintaze u produkciji ATP i obezbjeđivanju energije u dijelovima ćelije sa nižom koncentracijom O_2 (Skulachev, 1990; Westermann, 2012).

In vitro, pokazano je da noradrenalin, snažan aktivator BAT, indukuje potpunu i brzu fisiju mitohondrija u mrkim adipocitima putem fosforilacije Ser600 Drp1 proteina i razgradnjom Opa1. Ta promjena mitohondrijalne arhitekture je primjećena u primarnoj kulturi mrkih adipocita i u BAT miševa izloženih hladnoći. Štaviše, mitohondrijalna fisija mrkih adipocita RNK interferencijom Mfn2 povećava kapacitet egzogenih slobodnih masnih kiselina da povećaju potrošnju energije. Ovim je pokazano da noradrenalin, osim sposobnosti da stimulise lipolizu, indukuje potrošnju energije i putem mitohondrijalne fisije (Wikstrom i sar., 2014).

1.7 MITOHONDRIJE, ER I KALCIJUM

Mitohondrijama pridružene membrane (MAM) su visokospecijalizovani kompartmenti koji fizički i biohemijski povezuju ER i mitohondriju (Csordas i sar., 2006; Hayashi i sar., 2009;

Schon i Area-Gomez, 2013). Nastaju samim približavanjem ER i mitohondrije (de Brito i Scorrano, 2008; Fujimoto i sar., 2012) i na taj način se omogućavaju specijalizovane funkcije u koje su obe organele uključene (Hayashi i sar., 2009). Za razliku od drugih organela, MAM je dinamički kompartment ćelije, čiji sastav se mijenja u realnom vremenu, u zavisnosti od datih uslova. Identifikovano je 75 proteina koji su uključeni u MAM, kao što su proteini koji su uključeni u homeostazu Ca^{2+} (npr. $InsP_3$ receptori), metabolizam holesterola (npr. acil-CoA:holesterol acetiltransferaza - ACAT1) i metabolizam fosfolipida (npr. fosfatidilserin sintaza 2 - PTSS2) (Schon i Area-Gomez, 2013). Kontakt između ER i mitohondrije se održavaju proteinima kao što su: PACS2 (engl. *phosphofurin acidic cluster sorting protein 2*) koji stabilizuje i reguliše interakciju dvije navedene organele, i Mfn2, o kojem je bilo ranije riječi (Schon i Area-Gomez, 2013).

I ER i mitohondrije su značajne organele koje su neophodne za održanje Ca^{2+} homeostaze u ćeliji (Berridge, 2002), gdje MAM igra ključnu ulogu u interorganelarnom toku Ca^{2+} (Hayashi i sar., 2009). Do sad je identifikovano bar 11 proteina MAM koji su uključeni u Ca^{2+} trafficking - rijanodinski receptori, inozitol-1,4,5-trifosfatni ($InsP_3$) receptori i sigma-1 receptor (Schon i Area-Gomez, 2013).

Pokazano je da presenilin 2, protein prisutan u membrani ER, favorizuje bliski kontakt mitohondrija i ER, kao i njihovu razmjenu Ca^{2+} (Zampese i sar., 2011). Osim toga, utvrđeno je bogato prisustvo ovog proteina u MAM (Area-Gomez i sar., 2009), a u fibroblastima embriona miševa sa isključenim genom za presenilin 2 utvrđen je poremećaj mitohondrijalne funkcije, prije svega smanjen mitohondrijalni membranski potencijal i smanjena respiracija (Behbahani i sar., 2006). Upravo to pokazuje da je smanjen bioenergetski kapacitet posljedica smanjenog toka Ca^{2+} uslijed gubitka bliskog kontakta između mitohondrije i ER.

Na ćelijskim modelima, Cardenas i sar. (2010) su pokazali da je stalna razmjena Ca^{2+} između mitohondrije i ER neophodna da bi se održala funkcija mitohondrija, izbjegla mitofagija i osigurala ATP produkcija.

1.8 MRKI ADIPOCITI I KALCIJUM

Poznato je da adrenergička stimulacija dovodi do povećanja citosolne koncentracije Ca^{2+} u mrkim adipocitima (Leaver i Pappone, 2002; Nicholls, 2006). Unos Ca^{2+} od strane mrkih adipocita je pod kontrolom α_1 i β adrenergičkih receptora, gdje α_1 adrenergička stimulacija vodi do intracelularnog povećanja Ca^{2+} (Connolly i sar., 1984; Bronnikov i sar., 1999), a β

adrenergička stimulacija vodi ka inhibiciji unosa Ca^{2+} u mitohondrije (Connolly i Nedergaard, 1988). Interesantno, kod mrkih preadipocita, primjena α_1 agonista pokazala je slab efekat, a β -selektivan agonist (isoprotenerol) inicirao je povećanje Ca^{2+} koncentracije identično kao i primjena noradrenalina, pokazujući da se mrki preadipociti razlikuju od zrelih mrkih adipocita, gdje je Ca^{2+} signalizacija posredovana α_1 adrenergičkim receptorima (Dolgacheva i sar., 2003; Turovskii i sar., 2011).

Primjenom noradrenalina, mrki adipociti *in vitro* pokazuju povećanje citosolne Ca^{2+} koncentracije (Wilcke i Nedergaard, 1989) kao rezultat toka i intracelularnih i ekstracelularnih izvora Ca^{2+} (Lee i sar., 1993). Tuchiya i Nagai (1994) su pokazali, *in vitro* na svježe izolovanim pojedinačnim mrkim adipocitima, korišćenjem kalcijumskog indikatora fura-2, da primjenom noradrenalina dolazi do postepenog rasta citosolne Ca^{2+} koncentracije sa maksimumom pola sata poslije aplikacije noradrenalinom. Zaključili su da noradrenalin povećava koncentraciju Ca^{2+} u mrkim adipocitima i to uglavnom putem α -adrenergičkog receptora.

U eksperimentu na mrkim adipocitima životinja aklimatizovanih na hladnoću, Nakagaki i sar. (2005) pokazali su da noradrenalin i forskolin (diterpenski aktivator adenilat ciklaze) dovode do povećanja citosolne Ca^{2+} koncentracije, kao i do porasta koncentracije Ca^{2+} u mitohondrijama, a akumulacija Ca^{2+} u mitohondrijama zavisi od protonskog gradijenta dobijenog radom elektron transportnog lanca. To je u saglasnosti sa ranim studijama koje su ukazale da mitohondrije mogu da akumuliraju veliku količinu Ca^{2+} u zavisnosti od mitohondrijalnog energetskog metabolizma (Vasington i Murphy, 1962; Hittelman i sar., 1967).

1.9 MRKI ADIPOCITI I INSULIN

Brojne studije su pokazale da insulin reguliše aktivnost BAT (Rothwell i sar., 1981; Rothwell i Stock, 1981; Mur i sar., 2003; Matsuo i sar., 2011), homeostazu glukoze i insulinsku osjetljivost (Shackney i Joel, 1966; Orava i sar., 2011; Stanford i sar., 2013). Štaviše, insulin i IGF-1 (engl. *insulin growth factor-1*) igraju važnu ulogu u razvoju BAT, metabolizmu adipocita i termogenezi (Boucher i sar., 2012). Pokazano je da mrki adipociti fetusa pacova pokazuju visok afinitet ka insulinu i IGF-1, što ukazuje da su glavni signali uključeni u uspostavljanje i održanje adipogenih gena prisutni u fetalnim mrkim adipocitima (Teruel i sar., 1996). Akutna stimulacija diferenciranih mrkih adipocita insulinom vodi do fosforilacije Tyr ostataka i aktivacije svih elemenata uključenih u insulinsku signalizaciju, uključujući i insulin receptorne supstrate (IRS), mitogen aktiviranu protein kinazu (MAPK), fosfatidilinozitol-3 kinazu i protein kinazu B

(PKB) (Klein i sar., 1999; Fasshauer i sar., 2000; Klein i sar., 2002). Na taj način insulin indukuje unos glukoze, lipogenezu, sintezu glikogena i sintezu proteina (Klein i sar., 2002). Uloga insulina i IGF-1 je dobro proučavana korišćenjem primarne kulture mrkih adipocita (Porrás i sar., 1998; Valverde i sar., 1998a).

Insulin direktno stimuliše unos glukoze u BAT *in vivo* (Cooney i sar., 1985; Greco-Perotto i sar., 1987; Slot i sar., 1991) i u mrke adipocite *in vitro* (Czech i sar., 1974; Ebner i sar., 1987; Omatsu-Kanbe i sar., 1996). Insulin indukuje translokaciju intracelularnih GLUT₄ ka ćelijskoj membrani, modifikaciju samih GLUT₄ proteina i povećanje biosinteze, odnosno smanjenje razgradnje GLUT₄, i na taj način povećava unos glukoze (Omatsu-Kanbe i Kitasato, 1992; Valverde i sar., 1998b; Watson i Pessin, 2001). Unijeta glukoza se može iskoristiti za produkciju glicerol fosfata potrebnih za sintezu triacilglicerola ili se skladišti u vidu glikogena (Cannon i Nedergaard, 2004).

Sve veći značaj se pridaje vezi između mitohondrijalne homeostaze i insulinske signalizacije. Studija na mitohondrijama izolovanim iz jetre dijabetičnih i nedijabetičnih pacova pokazala je da je insulin važan za efikasnu ATP produkciju (Hall i sar., 1960). Osim toga, novije studije su pokazale da insulin poboljšava mitohondrijalnu funkciju skeletnih mišića (Stump i sar., 2003; Petersen i sar., 2005; Nisr i Affourtit, 2014). Sa druge strane, Boirie i sar. (2001) su utvrdili da insulin pokazuje tkivno specifično dejstvo na mitohondrijalne proteine.

Insulin značajnije doprinosi nastanku insulinske rezistencije nego hiperglikemija, što je pokazano u slučaju dijabetesa tipa 1 (Liu i sar., 2009). Blaga hiperinsulinemija može se tolerisati kratko vrijeme, ali hronična hiperinsulinemija pokreće insulinsku rezistenciju i doprinosi etiologiji dijabetesa (White, 2003). Uloga mitohondrija u insulinskoj rezistenciji je još uvijek kontroverzna jer nije još uvijek jasno da li je disfunkcija mitohondrija uzrok ili posljedica insulinske rezistencije, barem na studijama skeletnih mišića (Kelley i sar., 2002; Mootha i sar., 2003; Boushel i sar., 2007; Montgomery i Turner, 2015).

Veza između termogeneze, insulina i mitohondrija mrkih adipocita, i njihova uloga u dijabetesu i gojaznosti je dugo predmet debate, i to počevši od rezultata studija koje su pokazale specifičan pad termogenog kapaciteta mitohondrija (Atgie i sar., 1993) i povezanost poremećene termogeneze i insulinske rezistencije (Marette i sar., 1991a) u BAT gojaznih dijabetičnih pacova (Marette i sar., 1991b). Osim toga, najnovija studija je pokazala da disfunkcija mitohondrija ima mnogo veći efekat na insulinski odgovor, ali i zavisnost ovog efekta od tipa ćelije (Martin i sar., 2014). U eksperimentu *in vitro* sa IRS-1 deficitnim mrkim adipocitima, pokazano je da insulin ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije UCP₁ (Valverde

i sar, 2003). Primjenom tiazolidinediona, kao što je rosiglitazon, kojim se povećava insulinska osjetljivost, dolazi do mitohondrijalnog remodeliranja - povećanja mitohondrijalne mase i promjene mitohondrijalne strukture, što je uočeno u bijelim adipocitima (Wilson-Fritch i sar, 2003). Osim regulacije ćelijskog metabolizma kardiomiocita putem unosa glukoze, insulin stimuliše proteinsku ekspresiju Opa₁, mitohondrijalnu fuziju, povećava mitohondrijalni membranski potencijal, ATP produkciju i potrošnju kiseonika *in vitro* i *in vivo*, a takođe je pokazano da utišavanje Opa₁ ili Mfn2 dovodi do gubitka navedenih metaboličkih efekata insulina (Parra i sar, 2014).

2 | Cilj

Cilj ovog istraživanja jeste rasvjetljavanje molekulskih osnova strukturnog remodeliranja mitohondrija indukovano kalcijumom i insulinom u mrkim adipocitima pacova.

Neophodno je razumijevanje na koji način, kalcijum, s jedne strane, i insulin, s druge strane, utiču na aktivaciju termogeneze, odnosno povećanje termogenog kapaciteta mrkih adipocita. Regulacija termogeneze i povećanje termogenog kapaciteta mitohondrija mrkih adipocita u prvi plan ističu ulogu koju imaju kalcijum i insulin.

U tu svrhu, analiziraće se ultrastrukturno remodeliranje mitohondrija (oblik mitohondrija, srednji dijametar, volumenska gustina kristi), dinamika remodeliranja mitohondrija (fisija i fuzija mitohondrija, održanje mitohondrijalnog retikuluma, održanje balansa ključnih proteina uključenih u mitohondrijalno remodeliranje), kao i ekspresija proteina uključenih u remodeliranje mitohondrija, mitohondrijalnih markera, a i ER markera.

Kako postoji neraskidiva veza strukture i funkcije, cilj disertacije je i karakterizacija bioenergetskog kapaciteta mitohondrija, odnosno promjena proteinske ekspresije, aktivnosti i lokalizacije pojedinačnih kompleksa elektron transportnog lanca, ATP sintaze i inhibitornog faktora τ , i to u direktnoj korelaciji sa promjenama mitohondrijalne strukture. Na nivou konfokalne mikroskopije analiziraće se lokalizacija pojedinih ključnih mitohondrijalnih proteina, i to na nivou BAT, mrkih adipocita, a i mitohondrija mrkih adipocita i upoređivaće se sa istovremenom lokalizacijom UCP₁. Biohemijski će se analizirati aktivnost ATP sintaze, a na ultrastrukturnom nivou citohemijski će se analizirati kompleksi I i II. Osim toga, pratiće se efekat insulina na remodeliranje kristi primjenom kompjuterizovane tomografije.

Kako u osnovi mehanizma termogeneze leži formiranje i potrošnja proton pokretačke sile, analiziraće se efekat kalcijuma i insulina na bioenergetski kapacitet mrkih adipocita. Aktivacija termogeneze kao dijela metabolizma ćelija uključuje brojne signalne puteve i molekulske mehanizme, tako da je neophodno da se identifikuju ključni molekulske igrači koji imaju ulogu u svim navedenim procesima, prije svega pod djelovanjem kalcijuma i insulina. Osim analize proteinske ekspresije UCP₁, ključnog termogenog proteina mrkih adipocita,

pratiće se i proteinska ekspresija njegovih homologa, UCP₂ i UCP₃.

Ovakvim širokim uvidom u strukturni, metabolički i molekularni nivo mitohondrijalne homeostaze doprinjelo bi se razumijevanju uloge mitohondrija mrkih adipocita u patofiziologiji, ali i potencijalnim mogućnostima liječenja metaboličkog sindroma.

3 | Materijal i metodi

3.1 EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

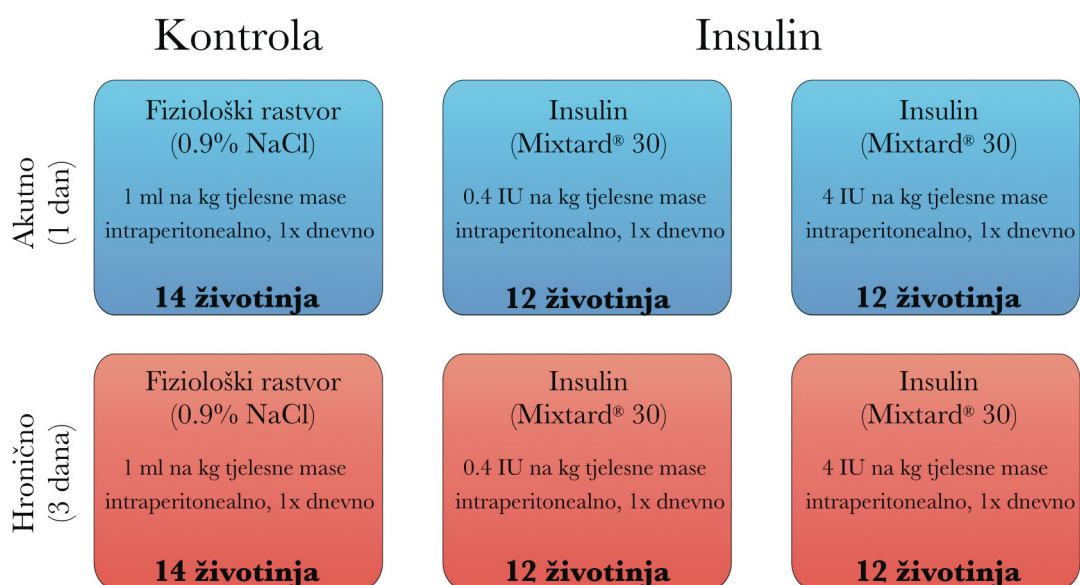
U eksperimentu su korišćeni mužjaci Wistar soja starosti dva mjeseca. Po odvajanju u kaveze, mjerena im je tjelesna masa. Imale su pristup česmenskoj vodi i briketiranoj hrani *ad libitum*, u uslovima konstantne vlažnosti sa temperaturom oko 22 ± 1 °C, dnevnog-noćnog režima od 12 sati svjetlosti i 12 sati mraka. Sve navedene procedure na životinjama su urađene u skladu sa EEC direktivom 86/609/EEC, odnosno EU direktivom 2010/63/EU, a odobrene su od strane Etičke komisije za rad sa životinjama Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.2 EKSPERIMENTALNI DIZAJN CA-SANDOZ TRETMANA

Pacovi, tjelesne mase od 160 do 240 g, podijeljeni su u dvije grupe. Jedna grupa je pila Ca-SANDOZ® (Novartis, Švajcarska) rastvoren u vodi (480 mg/l Ca^{2+}), a druga, kontrolna grupa, česmensku vodu, u trajanju od tri dana.

3.3 EKSPERIMENTALNI DIZAJN TRETMANA INSULINOM

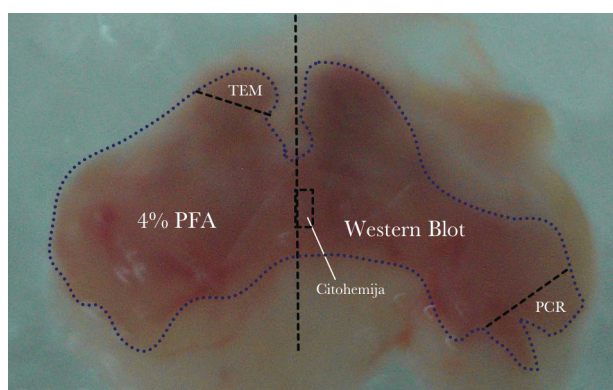
Eksperimentalne životinje, tjelesne mase od 190 do 260 g, podijeljene su u šest grupa, gdje su dvije grupe – kontrolne, tretirane fiziološkim rastvorom, a ostale grupe tretirane insulinom (Mixtard® 30, NovoNordisk, Danska) intraperitonealno (i.p.). Tretirane su akutno (1 dan) ili hronično (3 dana) niskom (0.4 IU/kg tjelesne mase) ili visokom (4 IU/kg tjelesne mase) dozom insulina (Slika 6).



Slika 6. Eksperimentalni dizajn tretmana insulinom.

3.4 ŽRTVOVANJE ŽIVOTINJA I IZOLACIJA

Životinjama je mjerena tjelesna masa i žrtvovane su dekapitacijom, bez anestezije. Odmah se pristupilo izolaciji interskapularnog depoa BAT, koji je očišćen od vezivnog tkiva i pripremljen za odgovarajuće metode (Slika 7). Za izolaciju mitohondrija uziman je cijeli interskapularni depo BAT od 6 životinja po grupi.



Slika 7. Priprema BAT za odgovarajuće analize.

3.5 IZOLACIJA MITOHONDRIJAMA BOGATE FRAKCIJE

Interskapularni depo BAT je očišćen od veziva i okolnog bijelog masnog tkiva, potom pulovan i stavljen u 250 mM rastvor saharoze. Svi koraci su rađeni na ledu. Izolacija mitohondrijama bogate frakcije je rađena po opisanom protokolu (Cannon i Lindberg, 1979; Cannon i Nedergaard, 2008) sa malim izmjenama. U uzorak BAT maceriran makazicama, dodato je 40 ml saharoznog rastvora i homogenizovan je Glas-Col high speed homogenizerom, 15 poteza na 4000 rpm. Dobijeni homogenat je filtriran kroz dvostruku gazu, i centrifugiran na 8500 g na 4 °C korišćenjem Optima L-100 XP ultracentrifuge (Beckman Coulter, SAD), deset minuta. Dobijeni supernatant sa gustim gornjim slojem lipida je odbačen brzim invertovanjem epruvete, a unutrašnjost epruvete je očišćena medicinskom gazom od nalijepljene masnoće. Talog je resuspendovan u maloj zapremini saharoznog rastvora, potom prebačen u novu epruvetu uz dodatak rastvora saharoze do 40 ml. Centrifugiran je na 800 g, deset minuta. Supernatant je prebačen u novu epruvetu, a talog je odbačen (jedro i ostaci ćelije). Ponovno je centrifugiran na 8500 g, deset minuta. Dobijeni talog je resuspendovan u 5 ml saharoznog rastvora sa 0.6% FAF-BSA i 1% EDTA, i centrifugiran na 8500 g, deset minuta. Konačno dobijeni talozi su resuspendovani u minimalnoj zapremini saharoznog rastvora, i proteinska koncentracija je određivana po Bradfordu. Alikvoti mitohondrijama bogatih frakcija su stavljeni u tečni azot i sačuvani na -80 °C.

3.6 PRIPREMA TKIVA ZA ANALIZE

3.6.1 PRIPREMA TKIVA ZA WESTERN BLOT ANALIZU

Odgovarajući isječki interskapularnog depoa BAT, koji su po izolaciji čuvani na -80 °C, su mjereni na vagi i očišćeni od preostalog vezivnog tkiva. Isječki iste mase od svake životinje su pulovani u okviru odgovarajućih grupa, i dodat je RIPA pufer (engl. *radio-immuno precipitation buffer*) (2 M NaCl, 10% Triton-X 100, 0.5 M Tris, 10% SDS, pH 7.5) sa koktelom proteaznih inhibitora (Roche, Švajcarska). Tkivo je macerirano, a potom homogenizovano uz pomoć Ultra-Turrax® T18 basic homogenizera (Ika, Njemačka) tri puta po deset sekundi, sa deset sekundi pauze. Dobijeni homogenat je sonifikovan na 10 kHz, tri puta po deset sekundi, sa deset sekundi pauze. Svi navedeni koraci su rađeni na ledu. Homogenati su centrifugirani na 37500 g sat i po vremena, na 4 °C u Optima L-100 XP ultracentrifugi. Pipetom je izdvojen supernatant i zamrznut na -20 °C. Dobijeni supernatanti su korišćeni za Western blot analizu.

3.6.2 PRIPREMA TKIVA ZA SVJETLOSNU I KONFOKALNU MIKROSKOPIJU

Odgovarajući dio tkiva je fiksiran u 4% paraformaldehidu u fosfatnom puferu (pH 7.4). Nakon 12 sati, ispiran je u česmenskoj vodi preko noći, i dehidratiran kroz seriju etanola rastuće koncentracije, prosvijetljen u ksilolu i ukalupljen u parafin. Ukalupljeno tkivo je potom sječeno na rotacionom mikrotomu (Reichert, Austrija) na presjeke odgovarajuće debljine i prenijeto na SuperFrost Plus mikroskopske pločice (Thermo Fisher Scientific, SAD).

3.6.3 PRIPREMA TKIVA ZA ELEKTRONSKU MIKROSKOPIJU

Odgovarajući tkivni isječci, veličine oko 1 mm³, fiksirani su u 2.5% rastvoru glutaraldehida u Sørensen fosfatnom puferu (0.1M, pH 7.2) 4 sata na 4 °C. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu, isječci su postfiksirani u 2% OsO₄ u istom puferu, dva sata, na sobnoj temperaturi i zaštićeni od svjetlosti. Potom su uzorci dehidratirani kroz seriju etanola rastuće koncentracije, prosvijetljeni u propilen oksidu i ukalupljeni u Araldit smolu (SigmaAldrich, Njemačka), na temperaturi od 50 °C, u trajanju od 72 sata.

Dio tkivnih isječaka, iste veličine kao i za elektronsku mikroskopiju, fiksiran je u rastvoru 2% paraformaldehida i 2% glutaraldehida u 0.1M fosfatnom puferu, sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu, uzorci su preinkubirani u 0.1% diaminobenzidinu (DAB, SigmaAldrich, Njemačka) u istom puferu, pola sata na sobnoj temperaturi u mraku. Potom je u preinkubacioni medijum dodat vodonik peroksid (finalno 0.01%), i uzorci su dalje inkubirani sat vremena u mraku na 37 °C. Korišćene su dvije negativne kontrole, i to – kontrola fiksacije (provjera da li je tkivo dobro fiksirano; prije preinkubacije), i kontrola inkubacije – tkivo je inkubirano u odsustvu vodonik peroksida (provjera DAB nespecifične reakcije). Uzorci su ponovno ispirani u fosfatnom puferu, i postfiksirani sat vremena u 1% OsO₄ u mraku, na sobnoj temperaturi. Konačno, dehidratirani su u etanolu rastuće koncentracije i rutinski ukalupljeni u Araldit smolu.

3.7 PRIPREMA KRVNIH RAZMAZA

Odmah nakon žrtvovanja napravljeni su krvni razmazi, koji su ostavljeni na vazduhu da se suše. Osušeni razmazi su fiksirani u metanolu 15 min. Rutinski su obojeni May-Grünwald-Giemsa bojom, i posmatrani i slikani pod svjetlosnim mikroskopom Leica DMLB (Leica Microsystems, Njemačka).

3.8 PRIPREMA MITOHONDRIJAMA BOGATE FRAKCIJE ZA ANALIZE

3.8.1 PRIPREMA MITOHONDRIJAMA BOGATE FRAKCIJE ZA WESTERN BLOT ANALIZU

U odgovarajuće alikvote mitohondrijama bogatih frakcija, koji su prethodno bili čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, dodat je RIPA pufer (2 M NaCl, 10% Triton-X 100, 0.5 M Tris, 10% SDS, pH 7.5) sa dodatim proteaznim inhibitorima (Roche, Švajcarska). Potom je vršena sonifikacija na 10 kHz, tri puta po deset sekundi, sa deset sekundi pauze. Svi navedeni koraci su rađeni na ledu. Uzorci su zamrznuti na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, i kasnije korišćeni za Western blot analizu.

3.8.2 PRIPREMA MITOHONDRIJAMA BOGATE FRAKCIJE ZA ELEKTRONSKU MIKROSKOPIJU

Po 50 μl finalne suspenzije mitohondrijama bogate frakcije fiksirano je dodavanjem 2.5% glutaraldehida u 0.1 M Sørensen fosfatnom puferu 15 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzorci su centrifugirani na 14000 g deset minuta, i nakon odlivanja supernatanta ispirani u fosfatnom puferu. Postfiksirani su u 1% OsO_4 , sat vremena na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svjetlosti. Talozi su dehidratirani u etanolu rastuće koncentracije i rutinski su ukalupljeni u Araldit smolu.

3.9 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA

3.9.1 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA TKIVA

Količina proteina je određivana po metodu **Lowry i sar. (1951)**. Metod se zasniva na reakciji peptidnih veza i Cu^{2+} jona u alkalnoj sredini i reakciji Folin-Ciocalteu reagensa (mješavina fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) sa aromatičnim aminokiselinama (Trp i Tyr) u polipeptidnim lancima. Nastalo kompleksno jedinjenje, plave boje, ima maksimum apsorpcije na 500 nm. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji proteina, koja se očitava sa standardne krive, konstruisane mjerenjem apsorpcije rastvora goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA), poznate koncentracije na 500 nm. Koncentracija proteina se izražava u mg/ml.

3.9.2 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA IZ MITOHONDRIJAMA BOGATE FRAKCIJE

Koncentracija proteina iz mitohondrijama bogate frakcije određivala se po **Bradford (1976)**, korišćenjem Quick Start Bradford Protein Assay kita (Bio-Rad, SAD), po uputstvu proizvođača.

3.10 SDS-PAGE I WESTERN BLOT

Proteini su razdvajani na osnovu njihove molekulske mase na Na⁺-dodecil sulfat-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) u Bio-Rad Mini-PROTEAN III sistemu. Korišćeni gelovi za razdvajanje su bile različite procentnosti (pH 8.8) u zavisnosti od molekulske mase ispitivanog proteina, a gelovi za koncentrisanje 5% (5% akrilamid/bisakrilamid, 0.1% SDS, 0.125 M Tris, pH 6.8). Polimerizacija gela je vršena dodavanjem 0.05% amonijum persulfata (APS) i 0.033% N,N,N',N'-tetraetilendiamina (TEMED). Pufer za rezervoare se sastojio od 0.192 M glicina, 0.1% SDS i 0.025 M Tris, pH 8.3. U određenu zapreminu proteinskog rastvora dodata je jednaka zapremina pufera za uzorke (4% SDS, 20% glicerol, 10% β-merkaptioetanol, 0.125 M Tris, pH 6.8, i 0.025% bromofenol plavo), a zatim su uzorci kuvani 5 min. Na gelove je nanošen i proteinski marker radi određivanja molekulskih masa (Thermo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza je trajala do 120 minuta pri konstantnom naponu od 120V.

Potom je vršen transfer proteina sa gelova na PVDF (poliviniliden fluorid) membrane (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, UK). Membrane su aktivirane u 100% metanolu, i to deset sekundi. Membrane i gelovi su pakovani i prebačeni u rezervoare sa transfer puferom (0.192 M glicin, 20% metanol, 0.025 M Tris, pH 8.3). Prenos proteina sa gelova na membrane odvijao se pri konstantnom naponu od 100V, 60 minuta. Uspješnost transfera je provjeravana bojenjem membrane 5% Ponceau S bojom, rastvorenoj u sirćetnoj kiselini. Potom su membrane inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi u serumu za blokiranje nespecifičnog vezivanja – 5% BSA u TBS-T (0.05% Tween-20 u 1.5 M NaCl, 0.2 M Tris, pH 7.4).

3.11 DETEKCIJA PROTEINA NAKON WESTERN BLOT ANALIZE

Nakon blokiranja, membrane su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitijelima rastvorenim u 5% BSA u TBS-T, preko noći, na 4 °C. Razblaženja su prikazana u Tabeli 1 i 2. Nakon inkubacije i ispiranja nevezanog primarnog antitijela, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitijelima konjugovanim sa peroksidazom rena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP), dobijenih imunizacijom koze na IgG zeca (ab6721, Abcam, UK; razblaženje 1:3000, u 5% BSA), odnosno miša (ab6789, Abcam; razblaženje 1:2000, u 5% BSA), dva sata, na sobnoj temperaturi. Poslije inkubacije, membrane su ispirane TBS-T puferom, najmanje 60 minuta.

Tabela 1. Primarna antitijela korišćena za Western Blot analizu Ca-SANDOZ tretmana

Antigen	Kataloški broj	Proizvođač	Porijeklo	Klonalnost	Razblaženje
Mfn1	ab57602	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	5 µg/ml
Mfn2	ab56889	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	5 µg/ml
Drp1	ab93942	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1 µg/ml
VDAC	ab34726	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1 µg/ml
Calnexin	ab22595	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1 µg/ml
ATPB	ab14730	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1 µg/ml
UCP1	ab10983	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000

Za vizuelizaciju proteina, membrane su inkubirane u hemiluminiscentnom supstratu, luminolu, uz dodatak vodonik peroksida, i to tri minuta. Potom su rentgen filmovi (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech, UK) izlagani ekscitovanom luminolu sa membrana u trajanju od 30 do 120 sekundi. Filmovi su razvijani, osušeni, i skenirani. Dobijeni skenovi su korišćeni za kvantifikaciju proteinskih traka.

Alternativno, membrane su inkubirane u rastvoru 4-hloro-*a*-naftola uz dodatak vodonik peroksida do pojave traka, u trajanju od dvije do deset minuta. Reakcija je prekidana ispiranjem membrane u destilovanoj vodi, a te membrane su potom skenirane za kvantifikaciju proteinskih traka.

Kvantifikacija je rađena u ImageQuant softveru (GE Healthcare, UK). Rezultati izraženi putem integracije volumena predstavljaju sumu vrijednosti svih piksela pobuđenih signalom (1 piksel = 0.007744 mm²) unutar označenog objekta, u našem slučaju – trake, koja je vizuelizovana na prethodno objašnjen način. Ova vrijednost, umanjena za *background* odnosno fon pozadine, predstavlja *volume*, tj. intenzitet zatamnjenja na cijeloj površini trake.

3.12 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ATP SINTAZE

Aktivnost ATP sintaze određivana je mjerenjem brzine hidrolize ATP pri konverziji fosfoenolpiruvata (PEP) u piruvat posredstvom piruvat kinaze (PK). Piruvat se redukuje do laktata posredstvom enzima laktat dehidrogenaze (LDH). Reakcioni medijum se sastojio od 40 mM TrisHCl, 10 mM EGTA, 0.2 mM NADH, 2.5 mM PEP, 25 µg/ml Antimycin A, 50 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml LDH, 0.5 mg/ml PK, 2.5 mM ATP (pH 8.0). Pratila se stopa oksidacije NADH u NAD⁺, spektrofotometrijski na 340 nm, na 30 °C. Reakcija je započeta dodavanjem 5 µg mitohondrijalnih proteina u 1 ml reakcionog medijuma. Validnost reakcije je provjeravana dodavanjem oligomicina. Dobijena aktivnost ATP sintaze tretiranih grupa je normalizovana u

Tabela 2. Primarna antitijela korišćena za Western Blot analizu kod tretmana insulinom.

Antigen	Kataloški broj	Proizvođač	Porijeklo	Klonalnost	Razblaženje
Mitohondrijama bogata frakcija					
NDUFA9	ab55521	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	2.5 µg/ml
SDHA	ab14715	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	0.1 µg/ml
UQCRC2	ab14745	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	0.5 µg/ml
Cyt c	ab18738	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	2.5 µg/ml
COXIV	ab14744	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	0.1 µg/ml
ATPB	ab14730	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1 µg/ml
IF1	ab110277	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1 µg/ml
UCP1	ab10983	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1 µg/ml
UCP2	ab67241	Abcam, UK	mišje	poliklonalno	2 µg/ml
UCP3	ab10985	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1 µg/ml
VDAC	ab34726	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1 µg/ml
Interskapularni depo BAT					
NDUFA9	ab55521	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	2.5 µg/ml
SDHA	ab14715	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	0.1 µg/ml
UQCRC2	ab14745	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	0.5 µg/ml
Cyt c	ab18738	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	2.5 µg/ml
COXIV	ab14744	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	0.1 µg/ml
ATPB	ab14730	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1 µg/ml
IF1	ab110277	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1 µg/ml
UCP1	ab10983	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1 µg/ml
UCP2	ab67241	Abcam, UK	mišje	poliklonalno	2 µg/ml
VDAC	ab34726	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1 µg/ml
Calnexin	ab22595	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1 µg/ml
Katalaza	ab1877	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1 µg/ml

odnosu na odgovarajuću kontrolu.

3.13 LOKALIZACIJA PROTEINA MIKROSKOPSKIM METODIMA

Za detekciju proteina mikroskopskim metodima korišćeni su parafinski presjeci debljine 7 µm, kao i aralditski polutanki presjeci debljine 2 µm. Svi parafinski presjeci su prethodno sprovedeni kroz rutinski proces deparafinizacije i rehidratacije. Aralditski polutanki presjeci su sprovedeni kroz proceduru uklanjanja smole u 1% rastvoru natrijum etoksida (1% natrijum hidroksid u apsolutnom etanolu) 30 minuta na 37 °C, a zatim i kroz rehidrataciju. U cilju otkrivanja antigenih mjesta (epitopa), presjeci su inkubirani 10 minuta (3 min za aralditske presjeke) u 10 mM citratnom puferu (pH 6.0) na 600 W u mikrotalasnoj pećnici i ispirani u TBS.

3.13.1 IMUNOHISTOHEMIJSKA LOKALIZACIJA PROTEINA

Poslije otkrivanja antigena i ispiranja u TBS, vršeno je blokiranje endogene peroksidaze u 3% rastvoru vodonik peroksida u metanolu deset minuta. Imunohistohemijska detekcija proteina je vršena korišćenjem ABC kita (ab93697, Abcam). Poslije ispiranja, presjeci su inkubirani u Protein Block (Abcam) radi spriječavanja nespecifičnog vezivanja, pola sata na sobnoj temperaturi. Potom su presjeci inkubirani sa primarnim antitijelima odgovarajuće dilucije, preko noći na 4 °C. Nakon ispiranja u TBS-T, presjeci su inkubirani u univerzalnoj smješi biotiniziranih sekundarnih antitijela koze (anti-mišje i anti-zečje antitijelo) – Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Plus (Abcam), deset minuta na sobnoj temperaturi. Prethodno ispirani presjeci su inkubirani sa konjugatom streptavidina i peroksidaze rena (Streptavidin Peroxidase Plus, Abcam) deset minuta, na sobnoj temperaturi. Detekcija mjesta vezivanja antitijela za odgovarajuće proteine u tkivu izvršena je inkubacijom presjeka u 0.05% DAB rastvorenom u TBS, u prisustvu 0.012% vodonik peroksida u mraku, sve do pojave bojene reakcije, najviše deset minuta. Reakcija je prekinuta ispiranjem česmenskom vodom, a kontrastiranje je izvršeno Majerovim hematoksilinom. Nakon rutinske dehidracije, napravljeni su trajni preparati montiranjem u DPX medijumu (SigmaAldrich).

U slučaju polutankih presjeka, poslije otkrivanja epitopa i ispiranja u PBS (pH 7.4), izvršeno je blokiranje endogene peroksidaze u 3% rastvoru vodonik peroksida u metanolu, deset minuta na sobnoj temperaturi. Po ispiranju, presjeci su inkubirani sa primarnim zečjim poliklonalnim anti-UCP1 antitijelom (ab10983, Abcam; razblaženje 1:1000), preko noći na 4 °C. Nakon ispiranja u PBS, izvršena je inkubacija sa univerzalnom smješom sekundarnih kozjih anti-mišjih i anti-zečjih IgG antitijela (LSAB universal kit, Dako Scientific, Danska; razblaženje 1:1) 25 minuta na sobnoj temperaturi. Potom su presjeci inkubirani sa konjugatom streptavidina i peroksidaze rena, takođe 25 minuta na sobnoj temperaturi. Detekcija vezanih antitijela u tkivu izvršena je inkubacijom presjeka u 0.05% DAB rastvorenom u PBS, u prisustvu 0.012% vodonik peroksida, do pojave bojene reakcije, i to do deset minuta. Reakcija je prekinuta ispiranjem u česmenskoj vodi, i kontrastiranje je izvršeno Majerovim hematoksilinom. Nakon dehidracije, presjeci su montirani u DPX medijumu.

Primarna antitijela korišćena za imunohistohemijsku detekciju proteina su navedena u Tabeli 3.

Uzorci su analizirani i slikani svjetlosnim mikroskopom DMLB opremljen DFC295 digitalnom kamerom (Leica Microsystems).

Tabela 3. Antitijela korišćena za imunohistohemijsku detekciju proteina.

Antigen	Kataloški broj	Proizvođač	Porijeklo	Klonalnost	Razblaženje
Mfn1	ab57602	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:500
Drp1	ab93942	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000
UCP1	ab10983	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000

3.13.2 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA PROTEINA

Poslije otkrivanja epitopa i ispiranja u TBS, presjeci su inkubirani u 10% normalnom kozjem serumu i 1% BSA u TBS, radi blokiranja nespecifičnog vezivanja, sat vremena na sobnoj temperaturi, a zatim sa odgovarajućim primarnim antitijelima (Tabela 4) preko noći na 4 °C. Poslije ispiranja u TBS-T (0.1% Tween-20), presjeci su bili inkubirani sa odgovarajućim sekundarnim kozjim antitijelima konjugovanim sa fluorohromima sat vremena na sobnoj temperaturi. Prethodno ispirani u TBS-T, presjeci su inkubirani fluorescentnim nukleusnim bojama - propidijum jodidom (SigmaAldrich; razblaženje 1:500) ili Sytox Orange (S11368, Life Technologies, SAD; razblaženje 1:1000) pet minuta. Konačno, presjeci su bili ispirani u TBS i montirani u Mowiolu (SigmaAldrich).

Za kolokalizacione analize, u zavisnosti od primarnih antitijela, korišćene su dva metoda: metod dvostruke simultane imunofluorescencije i metod dvostruke sekvencijalne imunofluorescencije (u slučaju da oba primarna antitijela potiču iz istog domaćina).

Vizuelizacija je vršena korišćenjem Leica konfokalnog mikroskopa TCS SP5 II (Leica Microsystems), i to u sekvencijalnom modu da bi se izbjeglo preklapanje između odgovarajućih kanala. Dvostruko obojeni uzorci su bili ekscitovani Ar laserom talasne dužine od 488 nm i HeNe laserom talasne dužine od 633 nm, a nukleusne boje su ekscitovane korišćenjem HeNe lasera talasne dužine od 543 nm. Negativna kontrola dobijena je izostavljanjem primarnih antitijela.

3.13.3 IMUNOGOLD LOKALIZACIJA PROTEINA

Za lokalizaciju proteina na nivou elektronske mikroskopije, korišćeni su tanki presjeci (70 nm) tkiva ukalpljenih u Araldit smolu, koji su montirani na niklovane mrežice presvučene olovkom za poboljšanje adhezije presjeka (Coat-Quick "G", Agar Scientific Ltd, UK). Poslije otkrivanja antigena u citratnom puferu (3 minuta na 600W) i ispiranja u TBS -T (0.1% Tween-20), vršeno je blokiranje inkubacijom u 5% BSA u TBS-T, sat vremena na sobnoj temperaturi. Mrežice su, potom, nanešene na kap primarnog antitijela odgovarajućeg

Tabela 4. Antitijela korišćena za imunofluorescentnu lokalizaciju proteina.

Antigen	Kataloški broj	Proizvođač	Porijeklo	Klonalnost	Razblaženje
Primarna antitijela					
NDUFA9	ab55521	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:100
SDHA	ab14715	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:100
UQCRC2	ab14745	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:100
Cyt c	ab18738	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:100
COXIV	ab14744	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:100
ATPB	ab14730	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:100
IF1	ab110277	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:100
UCP1	ab10983	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:1000
Mfn1	ab57602	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:100
VDAC	ab34726	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:100
Calnexin	ab22595	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:200
Katalaza	ab1877	Abcam, UK	zečje	poliklonalno	1:300
Sekundarna antitijela					
AlexaFluor 488 anti-rabbit	A-11034	LifeTech., USA	kozje	poliklonalno	1:400
AlexaFluor 488 anti-mouse	A-11029	LifeTech., USA	kozje	poliklonalno	1:400
AlexaFluor 633 anti-rabbit	A-21071	LifeTech., USA	kozje	poliklonalno	1:400
AlexaFluor 633 anti-mouse	A-21052	LifeTech., USA	kozje	poliklonalno	1:400

razblaženja i inkubirane preko noći na 4 °C. Ispirane su deset puta po 1 minut u TBS-T, te prebačene na kap odgovarajućeg sekundarnog antitijela, zapreminskog razblaženja 1:20, obilježenog česticama zlata dijametra 10 ili 20 nm, i inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi. Mrežice su ispirane deset puta po jedan minut u TBS-T, a potom pet puta po jedan minut u redestilovanoj vodi.

U slučaju lokalizacije dva proteina, korišćen je metod sekvencijalnog imunogold obilježavanja. Prvo je vršena inkubacija primarnim antitijelom, pa sekundarnim antitijelom sa česticama zlata manjeg dijametra (10 nm), pa potom drugim primarnim antitijelom i sekundarnim antitijelom sa česticama zlata većeg dijametra (20 nm). Primarna i sekundarna antitijela korišćena za imunogold lokalizaciju proteina su prikazana u Tabeli 5.

Poslije sušenja, mrežice su posmatrane i slikane na Philips/FEI CM12 transmisionom elektronskom mikroskopu (FEI, Holandija).

Tabela 5. Antitijela korišćena za imunogold lokalizaciju proteina.

Antigen	Kataloški broj	Proizvođač	Porijeklo	Klonalnost	Razblaženje
Primarna antitijela					
UQCRC2	ab14745	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:100
COXIV	ab14744	Abcam, UK	mišje	monoklonalno	1:100
Sekundarna antitijela					
Goat anti-mouse IgG (10 nm Gold)	ab27241	Abcam, UK	kozje	poliklonalno	1:20
Goat anti-mouse IgG (20 nm Gold)	ab27242	Abcam, UK	kozje	poliklonalno	1:20

3.14 LOKALIZACIJA KALCIJUMA MIKROSKOPSKIM METODAMA

3.14.1 ALIZARIN RED S BOJENJE

Poslije uklanjanja smole u 1% natrijum etoksidu na 37 °C pola sata, i rutinske rehidracije, polutanki presjeci su inkubirani u 2% rastvoru Alizarin Red S (pH 4.2) do pet minuta, a potom ispirani u acetonu i smješi acetona i ksilola. Poslije prosvijetljenja u ksilolu, presjeci su montirani u DPX smolu i posmatrani i slikani Leica DMLB mikroskopom. Alizarin Red S pokazuje lokalizaciju kalcijuma formiranjem nerastvorljivih depozita sa Ca²⁺ jonima, dajući crveno-narandžastu reakciju.

3.14.2 PRECIPITACIJA KALIJUM PIROANTIMONATOM

Isječci tkiva su fiksirani u 2.5% glutaraldehidu u 0.1 M Sørensen fosfatnom puferu (pH 7.2) u koji je dodat kalijum piroantimonat (finalne koncentracije 2%), četiri sata. Uzorci su ispirani u istom fosfatnom puferu, postfiksirani u OsO₄ u fosfatnom puferu sa antimonatom, dva sata na sobnoj temperaturi. Poslije ispiranja u fosfatnom puferu bez antimonata, uzorci su dehidratirani u rastućoj koncentraciji etanola i rutinski ukalupljeni u Araldit smolu. U slučaju negativne kontrole, uzorci su fiksirani i postfiksirani u fosfatnom puferu bez antimonata. Ovim metodom se detektuje *in situ* lokalizacija kalcijuma, gdje antimonat formira crne precipitate sa Ca²⁺ jonima.

3.15 KOLOKALIZACIONA STUDIJA MITOHONDRIJA I ENDOPLAZMINOG RETIKULUMA

Odmah nakon disekcije, interskapularni depo BAT je isjeckan na komadiće tkiva korišćenjem vibratoma. Komadići tkiva su inkubirani u PBS sa 100 nM MitoTracker Orange

CMTMROS (M7510, Invitrogen, Darmstadt, Njemačka) i 1 μ M ER-Tracker Green (E34251, Invitrogen) i to 45 minuta na 37 °C. Poslije inkubacije komadići su ispirani dva puta u PBS, fiksirani u 4% paraformaldehidu u PBS. Poslije finalnog ispiranja u PBS, montirani su na mikroskopske pločice u Mowiol medijumu, i posmatrani na Leica konfokalnom mikroskopu TCS SP5 II, u sekvencijalnom modu, da bi se izbjeglo preklapanje između odgovarajućih detekcionih kanala. MitoTracker Orange CMTMROS, koji se aktivno akumulira u mitohondrijama tokom inkubacije, ekscitovan je HeNe laserom talasne dužine 543 nm. ER Tracker Green je boja konjugovana sa glibenklamidom koja se vezuje za sulfonilurea receptore ATP-zavisnih kalijumovih kanala, kojima je bogat ER. Ova boja je ekscitovana Ar laserom talasne dužine 514 nm.

Kolokalizacija je određivana uz pomoć LAS AF softvera (Leica Microsystems), korišćenjem sljedećih parametara: prag (engl. *threshold*) 30% i pozadina (engl. *background*) 20%. Stopa kolokalizacije (engl. *colocalization rate*, %) je određivana dijeljenjem kolokalizacione površine (engl. *colocalization area*) sa površinom u prvom planu (engl. *area foreground*). Površina u prvom planu se dobija oduzimanjem površine pozadine (engl. *area background*) od površine slike (engl. *area image*).

3.16 ULTRASTRUKTURNA ANALIZA TKIVA I MITOHONDRIJAMA BOGATE FRAKCIJE

Za analizu na nivou TEM, uzorci tkiva, odnosno mitohondrijama bogatih frakcija kalupljeni u Aralditu, su trimovani i sječeni dijamantskim nožem (Diatome, Švajcarska) na tanke presjeke od 70 do 150 nm, na UC6 ultramikrotomu (Leica Microsystems). Presjeci su montirani na bakarne ili bakar-paladijumske mrežice, kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom na EM STAIN aparatu (Leica Microsystems), a potom posmatrani na FEI/Philips CM12 transmisionom mikroskopu, pri naponu od 60 kV.

Elektronske mikrografije su snimane uz pomoć digitalne kamere SIS MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Njemačka), pri rezoluciji od 1,376 x 1,032 piksela.

3.16.1 TOMOGRAFSKA REKONSTRUKCIJA MITOHONDRIJA

Za tomografsku rekonstrukciju mitohondrija, korišćeni su presjeci mitohondrijama bogatih frakcija debljine 100 ili 200 nm, montirani na niklovane mrežice presvučene formvarom. Tako dobijeni presjeci su obilježeni partikulama zlata imunogold metodom (dijametra 10 nm za

kompleks III, a dijametra 20 nm za kompleks IV), radi dobijanja markera neophodnih za tomografske rekonstrukcije. Snimana je tilt serija, pri veličini piksela od 4.67 nm. Tilt serija se sastojala od mikrografija snimanih svaki stepen, od -45° do $+45^\circ$. Poravnanje (engl. *alignment*) takvih mikrografija ukrštenom korelacijom (engl. *cross-correlation*) i rekonstrukcijom vršeno je pomoću IMOD eTomo softvera (<http://bio3d.colorado.edu/imod/>).

3.16.2 ULTRASTRUKTURNA ANALIZA MITOHONDRIJA

Broj mitohondrija je određivan brojanjem mitohondrija na $100 \mu\text{m}^2$ površine mrkih adipocita presječenih u nivou nukleusa. Ukupno je analizirano pedeset elektronskih mikrografija po grupi, odabranih po principu slučajnosti.

Srednji mitohondrijalni dijametar je dobijen kao prosječna vrijednost mjerenih dijametara u dvije ose (duži i kraći dijametar). Analizirano je 200 mitohondrija po grupi, korišćenjem elektronskih mikrografija. Na osnovu srednjeg dijametra, mitohondrije su podijeljene u odgovarajuće klase, i prikazivana je distribucija mitohondrijalnih klasa po analiziranim grupama.

Navedene analize su rađene uz pomoć iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions, Njemačka) ili ImageJ (NIH, SAD) softvera.

3.17 CITOHEMIJSKA ANALIZA KOMPLEKSA I I II *IN SITU*

Reakcija se zasniva na redukciji fericijanida od strane kompleksa I i II u prisustvu odgovarajućih supstrata. Protokol je rađen po Ogawa i sar. (1968). Ukratko, odmah poslije izolacije BAT, parče tkiva veličine 1 mm^3 inkubirano je dva sata u odgovarajućim medijumima.

Za citohemijsku analizu kompleksa I u medijum je dodat NADH_2 , a za kompleks II u medijum je dodat sukcinat. Osim toga, korišćeni su i inhibitori, i to: rotenon (specifičan inhibitor kompleksa I) i oksaloacetat (specifičan inhibitor kompleksa II). Po jedan uzorak kontrolnih grupa inkubiran je u odgovarajućim medijumima uz dodatak navedenih inhibitora.

Uzorci su zatim fiksirani u 2.5% glutaraldehidu u 0.1 M Sørensen fosfatnom puferu, 5 sati na 4°C , ispirani u fosfatnom puferu i postfiksirani u 2% OsO_4 u istom puferu, sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon dehidracije u rastućoj koncentraciji etanola uzorci su rutinski ukalupljeni u Araldit smolu.

3.18 STEREOLOŠKE ANALIZE

3.18.1 STEREOLOŠKA ANALIZA MRKIH ADIPOCITA

U cilju određivanja volumenske gustine mrkih adipocita u BAT, korišćeni su presjeci tkiva ukalupljenih u Araldit smolu, debljine 2 μm , koji su prethodno obojeni 1% rastvorom toluidin plavog u 1% natrijum tetraboratu. Bojenje je vršeno nakapavanjem jednake zapremine toluidin plavog i natrijum tetraborata na presjeke, uz zagrijavanje na grijnoj ploči dvije minute, nakon čega su presjeci ispirani u česmenskoj vodi. Volumenska gustina mrkih adipocita određena je Weibel metodom (Weibel i sar., 1969), na po deset nasumično odabranih testnih polja od svake životinje iz svih grupa. Analiza je vršena na svjetlosnom Leica DMLB mikroskopu, korišćenjem Weibel višenamjenskog testnog okulara sa 42 tačke. Odnosom zbira svih tačaka koje padaju na mrke adipocite i ukupnog broja tačaka koje padaju na BAT određena je V_v mrkih adipocita korišćenjem sljedeće formule:

$$V_v = \frac{P_x}{P_{total}}$$

Gdje je V_v – volumenska gustina, P_x – broj tačaka koje padaju na strukturu od interesa, a P_{total} je ukupan broj tačaka koje padaju na tkivo, odnosno ćeliju.

3.18.2 STEREOLOŠKA ANALIZA LIPIDNIH TIJELA

Volumenska gustina lipidnih tijela je određivana na sličan način kao i volumenska gustina mrkih adipocita, s tim što je broj tačaka koje padaju na lipidna tijela računat u odnosu na broj tačaka koje padaju na mrke adipocite.

3.18.3 STEREOLOŠKA ANALIZA MITOHONDRIJA

Volumenska gustina mitohondrija mrkih adipocita određena je kao odnos broja tačaka Weibel višenamjenskog testnog sistema koje padaju na mitohondrije u odnosu na broj tačaka koje padaju na mrke adipocite.

Volumenska gustina mitohondrijalnih kristi određena je na sličan način, s tim da se računao odnos broja tačaka koje padaju na kriste i broja tačaka koje padaju na mitohondriju. Na osnovu volumenske gustine kristi, mitohondrije su podijeljene u odgovarajuće klase i prikazivana je distribucija mitohondrijalnih klasa po analiziranim grupama.

Navedene stereološke analize mitohondrija su rađene na elektronskim mikrografijama korišćenjem iTEM softvera.

3.19 STATISTIČKE ANALIZE

U Ca-SANDOZ tretmanu razlike među grupama su testirane Studentovim t-testom, a u tretmanu insulinom razlike među grupama su analizirane jednosmjernom (engl. *one-way*) ANOVA, a potom Tukey *post-hoc* testom kako bi se utvrdile značajnosti između pojedinih grupa. Za najniži stepen značajnosti uzeta je $p \leq 0.05$. Za navedene statističke analize korišćen je GraphPad Prism 6.0 program (GraphPad Software, SAD) za Mac OS X.

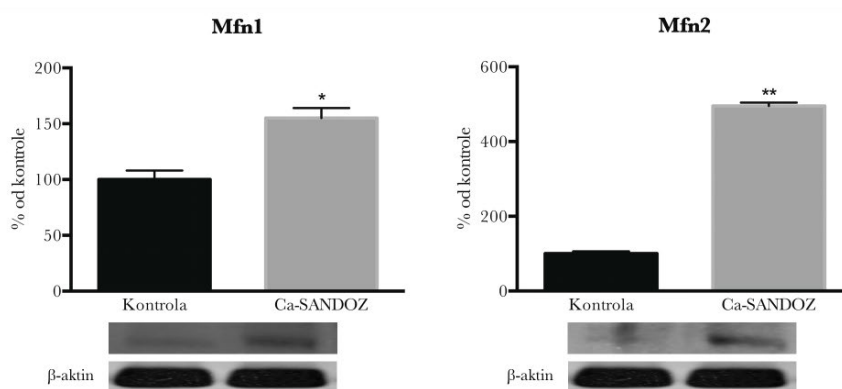
4 | Rezultati

4.1 CA-SANDOZ TRETMAN

4.1.1 WESTERN BLOT ANALIZA

4.1.1.1 PROTEINSKA EKSPRESIJA MFN1 I MFN2

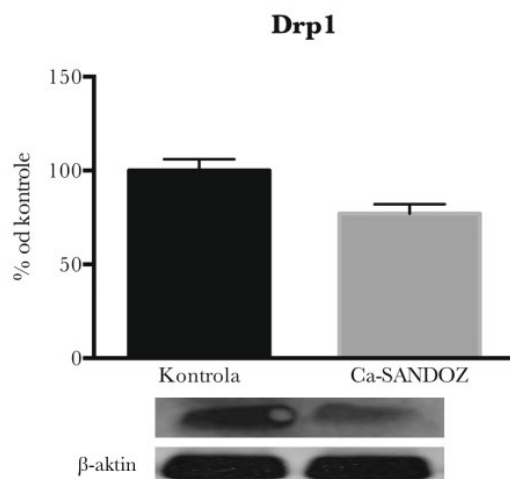
Proteinski sadržaj molekularnih igrača mitohondrijalne fuzije, Mfn1 i Mfn2, značajno je veći u Ca-SANDOZ grupi u poređenju sa kontrolom (Slika 8), pri čemu je proteinska ekspresija Mfn2 proteina petostruko uvećana.



Slika 8. Promjene proteinske ekspresije Mfn1 i Mfn2 nakon Ca-SANDOZ tretmana. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

4.1.1.2 PROTEINSKA EKSPRESIJA DRP1

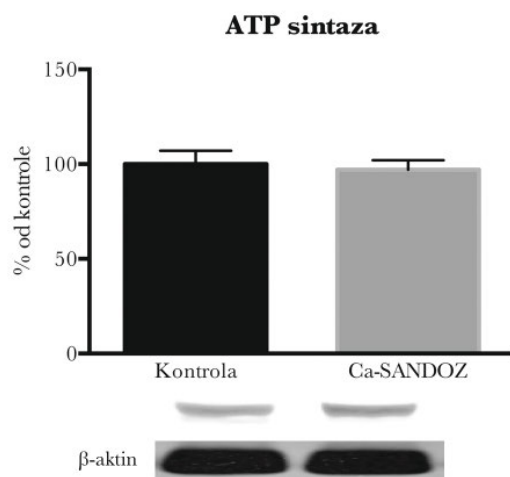
Ekspresija Drp1, proteina neophodnog za mitohondrijalnu fisiju, smanjena je, mada bez statističke značajnosti, u Ca-SANDOZ grupi u poređenju sa kontrolom (Slika 9).



Slika 9. Promjena proteinske ekspresije Drp1 nakon Ca-SANDOZ tretmana.

4.1.1.3 PROTEINSKA EKSPRESIJA ATP SINTAZE

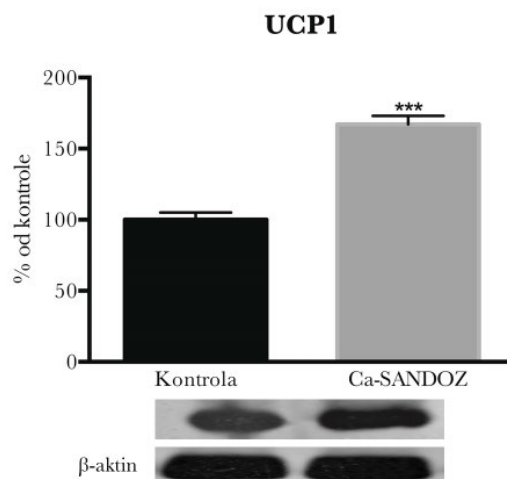
U poređenju sa kontrolom, proteinska ekspresija β subjedinice ATP sintaze je smanjena u Ca-SANDOZ grupi, ali nije statistički značajna (Slika 10).



Slika 10. Promjena proteinske ekspresije ATP sintaze nakon Ca-SANDOZ tretmana.

4.1.1.4 PROTEINSKA EKSPRESIJA UCP1

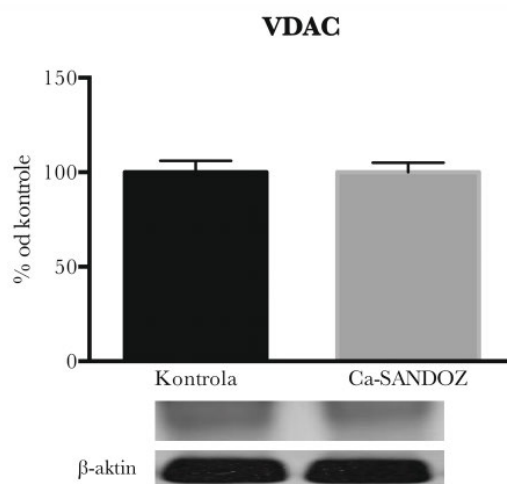
Western blot analiza je pokazala značajno povećanje proteinske ekspresije UCP1 proteina u Ca-SANDOZ grupi u poređenju sa kontrolom (Slika 11).



Slika 11. Promjena proteinske ekspresije UCP₁ nakon Ca-SANDOZ tretmana. * poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p \leq 0.001$.

4.1.1.5 PROTEINSKA EKSPRESIJA VDAC

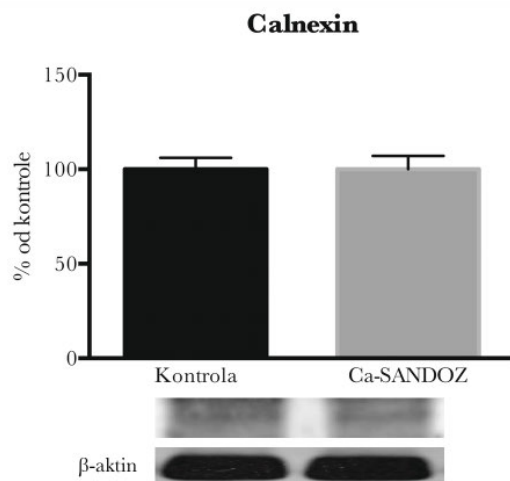
Proteinska ekspresija VDAC, mitohondrijalnog markera, proteina koji se nalazi u spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, ostaje nepromjenjena nakon Ca-SANDOZ tretmana u poređenju sa kontrolom (Slika 12).



Slika 12. Promjena proteinske ekspresije VDAC nakon Ca-SANDOZ tretmana.

4.1.1.6 PROTEINSKA EKSPRESIJA KALNEKSINA

U poređenju sa kontrolom, proteinski sadržaj kalneksina, integralnog proteina ER, ostaje nepromjenjen nakon Ca-SANDOZ tretmana (Slika 13).

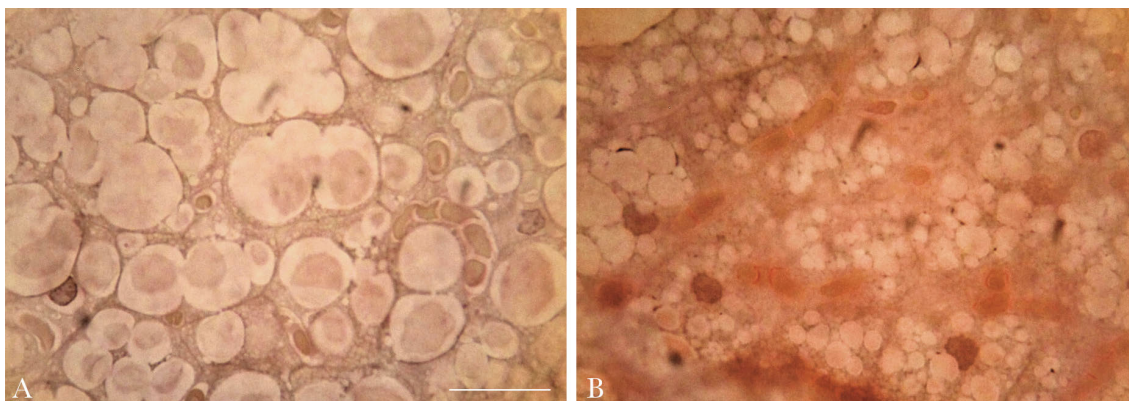


Slika 13. Promjena proteinske ekspresije kalneksina nakon Ca-SANDOZ tretmana.

4.1.2 MIKROSKOPSKE ANALIZE

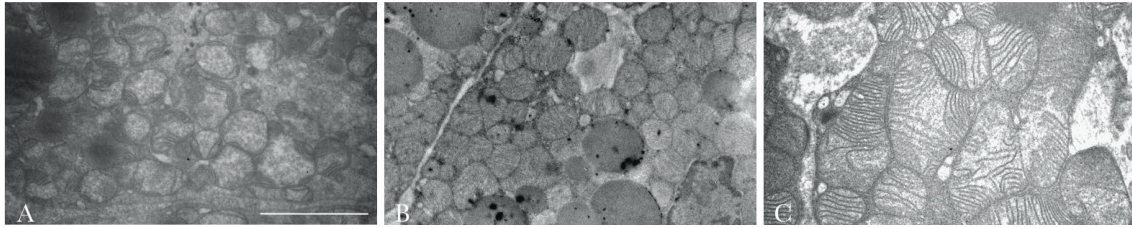
4.1.2.1 LOKALIZACIJA KALCIJUMA U MRKIM ADIPOCITIMA

Alizarin Red S histohemijsko bojenje pokazuje viši nivo Ca^{2+} soli u tretiranoj grupi, što se uočava u vidu grupe mrkih adipocita sa jačim intenzitetom crvene boje (Slika 14).



Slika 14. Alizarin Red S bojenje BAT nakon Ca-SANDOZ tretmana. (A) Kontrola; (B) Ca-SANDOZ. Bar: 20 μm .

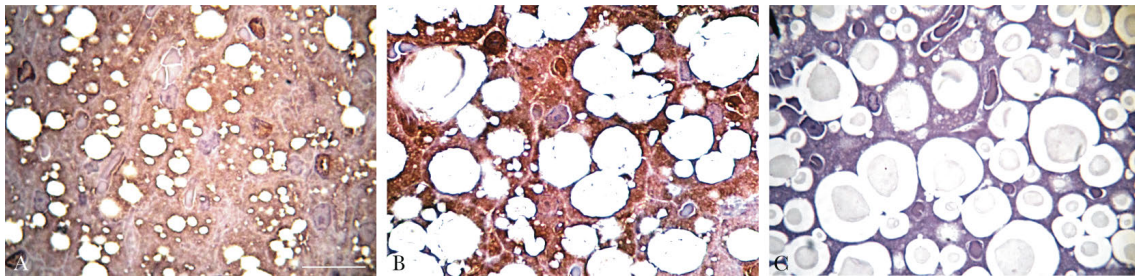
Na ultrastrukturnom nivou, kalijum piroantimonat demonstrira lokalizaciju Ca^{2+} jona u vidu elektron-gustih precipitata u citoplazmi, mitohondrijama i oko lipidnih tijela. Veća je zastupljenost precipitata u Ca-SANDOZ grupi u odnosu na kontrolu. Negativna kontrola ne pokazuje precipitate piroantimonata u mrkim adipocitima (Slika 15).



Slika 15. Lokalizacija kalcijuma kalijum piroantimonatom nakon Ca-SANDOZ tretmana. (A) Kontrola; (B) Ca-SANDOZ; (C) negativna kontrola. Bar: 2 μm .

4.1.2.2 UCP1 IMUNOHISTOHEMIJA

Imunohistohemijaska analiza pokazuje viši nivo ekspresije UCP1 proteina u Ca-SANDOZ grupi (Slika 16), u poređenju sa kontrolnom grupom.



Slika 16. Imunohistohemijaska analiza UCP1 proteina nakon Ca-SANDOZ tretmana. (A) Kontrola; (B) Ca-SANDOZ; (C) negativna kontrola. Bar: 20 μm .

4.1.2.3 STEREOLOŠKA ANALIZA MRKIH ADIPOCITA I LIPIDNIH TIJELA

Stereološke analize mrkih adipocita i lipidnih tijela pokazuju značajan pad volumenske gustine mrkih adipocita u BAT i lipidnih tijela u mrkim adipocitima nakon Ca-SANDOZ tretmana (Tabela 6) u poređenju sa kontrolom.

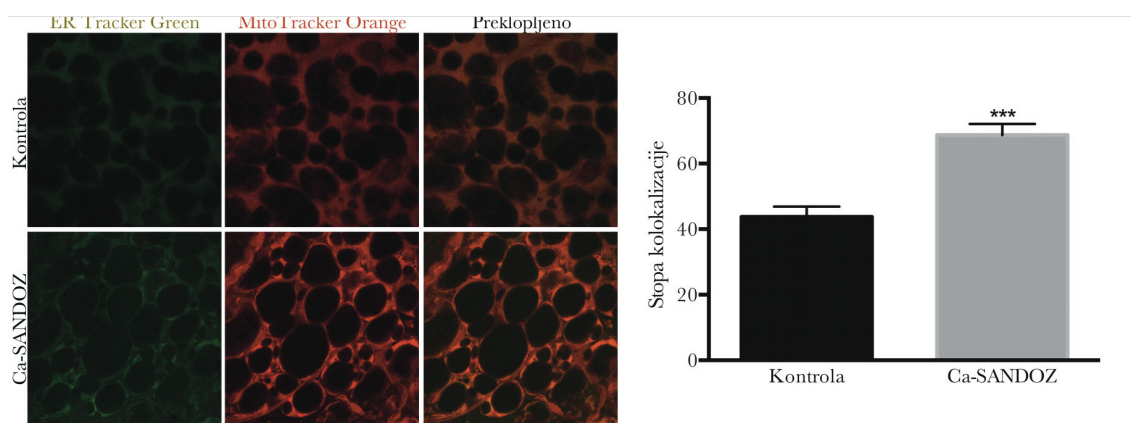
Tabela 6. Efekat Ca-SANDOZ tretmana na volumensku gustinu mrkih adipocita i lipidnih tijela.

	Kontrola	Ca-SANDOZ
Volumenska gustina mrkih adipocita (%)	83.51 ± 0.69	$57.89 \pm 0.69^*$
Volumenska gustina lipidnih tijela (%)	43.63 ± 2.14	$27.67 \pm 0.87^*$

*poređenje sa kontrolnom grupom; * $p \leq 0.05$.

4.1.2.4 KOLOKALIZACIONA ANALIZA MITOHONDRIJA I ER

Konfokalna mikroskopija pokazuje viši stepen kolokalizacije između aktivnih mitohondrija i ER u Ca-SANDOZ tretiranoj grupi u poređenju sa kontrolom (Slika 17).



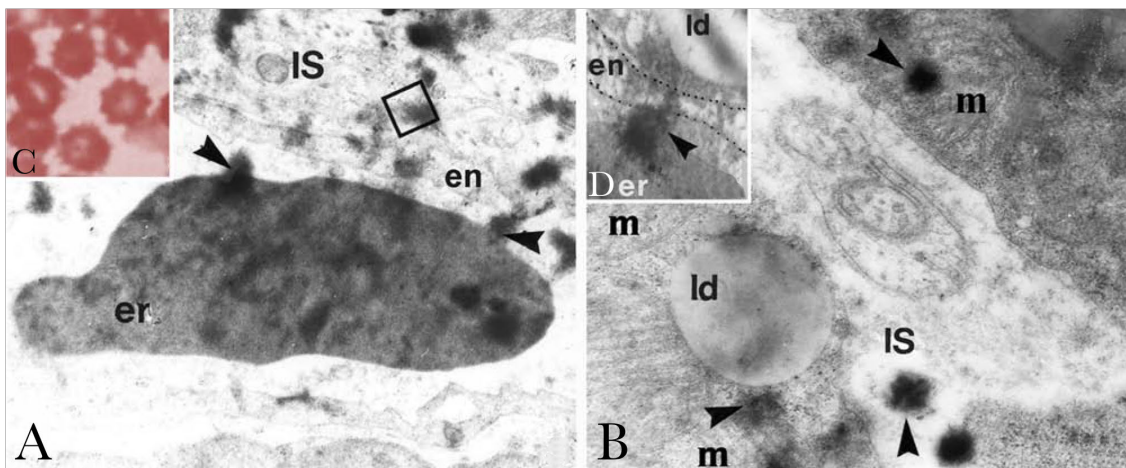
Slika 17. Kolokalizaciona analiza mitohondrija i ER nakon Ca-SANDOZ tretmana. (A) Konfokalne mikrografije BAT nakon inkubacije ER Tracker Green (*zeleno*) i MitoTracker Orange (*crveno*). Bar: 5 μm . (B) Stopa kolokalizacije ER i mitohondrija. *poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p \leq 0.001$.

4.1.3 ULTRASTRUKTURNE ANALIZE

4.1.3.1 EGZOVEZIKULACIJA ERITROCITA I ULAZ ERITROCITNIH KOMPLEKSA U MRKE ADIPOCITE I MITOHONDRIJE

U Ca-SANDOZ grupi primjećeno je prisustvo i lokalizacija brojnih elektron-gustih, hemihromnih kompleksa u vidu egzovezikula i to počevši od eritrocita u kapilarima, pa do mitohondrija mrkih adipocita (Slika 18). Formiranje hemihromnih kompleksa započinje u kapilarnim eritrocitima, nastale egzovezikule prolaze endotel i međucelijski prostor i ulaze u citoplazmu i mitohondrije mrkih adipocita (Slika 18). Egzovezikulacija se veoma rijetko primjećuje u kontrolnoj grupi.

Neki od tih hemihromnih kompleksa su razgranati, okruženi amorfnim materijalom i sa vidljivom poroznošću (Slika 19), što detaljnije uočavamo u mrkim adipocitima, gdje jedan kompleks ulazi u mitohondriju, a drugi kompleks je u bliskom kontaktu sa mitohondrijalnom kristom (Slika 19A).



Slika 18. Egzovezikulacija eritrocita i migracija hemihromnih kompleksa u BAT pacova tretiranih Ca-SANDOZ. (A) Degradacija hemoglobina i formiranje hemihromnih kompleksa unutar eritrocita (er), formiranje eritrocitnih vezikula (strelice) i prolazak hemihromnog kompleksa (kvadrat) kroz endotelne ćelije (en) i međućelijski prostor (IS). Uveličanje: $\times 16.000$. (B) Brojni Ca-SANDOZ indukovani kompleksi (strelice) iz međućelijskog prostora ulaze u citoplazmu i mitohondrije (m) mrkih adipocita. (ld) - lipidno tijelo. Uveličanje: $\times 17.000$. (C) Svjetlosna mikroskopija krvnih razmaza pokazuje transformaciju eritrocita u ehinocite. Uveličanje: $\times 20$. (D) Na mjestu prolaza hemihromnih kompleksa, zid endotela (en) je sužen. Uveličanje: $\times 35.200$.

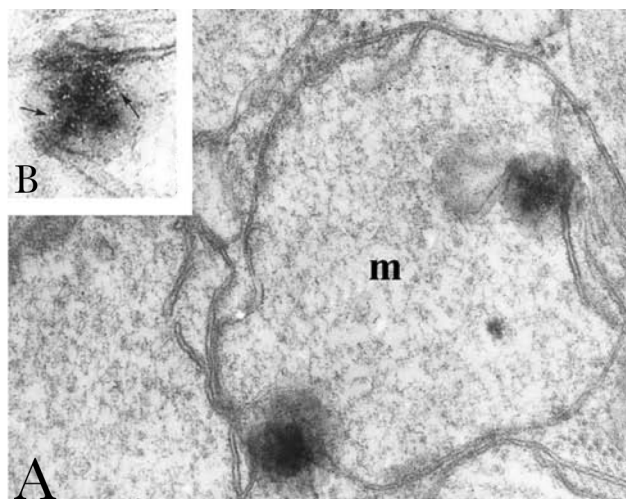
4.1.3.2 ULTRASTRUKTURNA ANALIZA MITOHONDRIJA

Mitohondrije mrkih adipocita pokazuju mnoge varijacije u unutrašnjoj strukturi, što se vidi na elektronskim mikrografijama (Slika 20). U kontrolnoj grupi (Slika 20A), mitohondrije su okrugle, sa nekoliko lamelarnih kristi. Ca-SANDOZ grupa se odlikuje većim mitohondrijama, nalik na fuzionisane, sa većim brojem veoma dobro razvijenih lamelarnih kristi (Slika 20B).

U Ca-SANDOZ grupi, megamitohondrije su uočene u pojedinim mrkim adipocitima (Slika 21).

4.1.3.3 STEREOLOŠKA ANALIZA MITOHONDRIJA

Ca-SANDOZ tretman izaziva statistički značajan pad broja mitohondrija na $100 \mu\text{m}^2$ (Slika 22A), dok je volumenska gustina mitohondrija u mrkim adipocitima gotovo nepromjenjena (Slika 22B).



Slika 19. Granati migratorni kompleksi indukovani Ca-SANDOZ tretmanom. (A) Dva kompleksa u nabubreloj mitohondriji (m) mrkog adipocita, jedan u fazi ulaska, a drugi u mitohondriji u bliskom kontaktu sa kristom. Uveličanje: x124.400. (B) Uočava se poroznost hemihromnih kompleksa (strelice). Uveličanje: x123.200.

4.1.3.4 DISTRIBUCIJA MITOHONDRIJA PO SREDNJEM DIJAMETRU

U poređenju sa kontrolnom grupom, u Ca-SANDOZ grupi se uočava pomjeranje srednjih mitohondrijalnih dijametara ka višim vrijednostima, odnosno uočava se sve veći broj mitohondrija sa većim srednjim dijametrom (Slika 23).

4.1.3.5 DISTRIBUCIJA MITOHONDRIJA PO VOLUMENSKOJ GUSTINI KRISTI

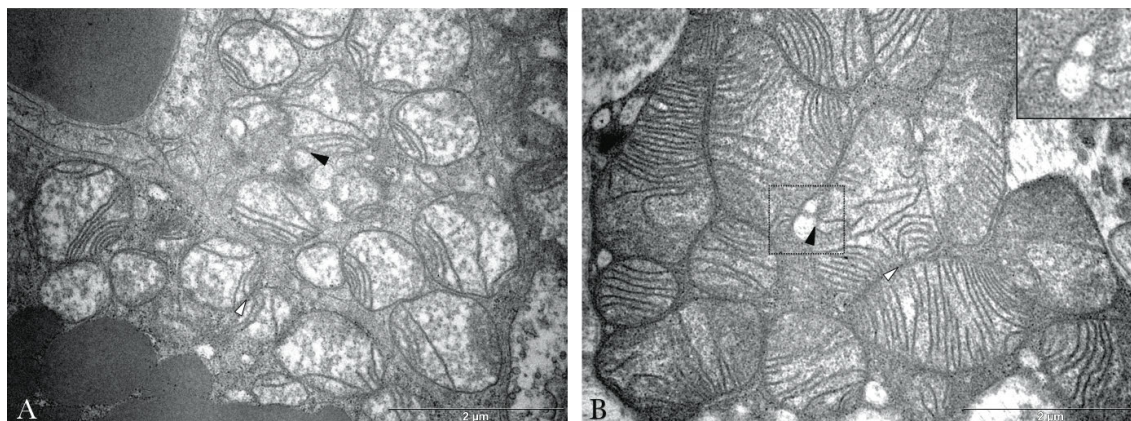
Analiza volumenske gustine mitohondrijalnih kristi pokazuje da Ca-SANDOZ stimuliše formiranje kristi, što se uočava kao veći broj mitohondrija sa većom volumenskom gustinom kristi u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 24).

4.2 TRETMAN INSULINOM

4.2.1 WESTERN BLOT ANALIZA MITOHONDRIJAMA BOGATE FRAKCIJE

4.2.1.1 PROTEINSKA EKSPRESIJA KOMPLEKSA ELEKTRON TRANSPORTNOG LANCA I CYT C

Nivo proteinske ekspresije kompleksa elektron transportnog lanca u mitohondrijama bogatoj frakciji BAT određivan je poslije akutnog (Slika 25) i hroničnog (Slika 26) tretmana niskom (0.4 IU), odnosno visokom (4 IU) dozom insulina. Poslije akutnog tretmana,



Slika 20. Mitochondrije mrkih adipocita nakon Ca-SANDOZ tretmana. (A) Okrugle mitochondrije sa nekoliko lamelarnih kristi u kontrolnoj grupi. Uočavaju se intimni kontakti između mitohondrija (bijele strelice), i između mitohondrija i ER (crne strelice). (B) Veće mitochondrije sa brojnim kristama u Ca-SANDOZ grupi. Detalj intimnog kontakta između mitohondrija i ER (kvadrat) u gornjem desnom uglu. Bar: 2 μ m.

proteinski sadržaj svih ispitivanih kompleksa elektron transportnog lanca i *cyt c* je značajno povećan primjenom niske doze insulina. Visoka akutna doza insulina indukuje značajno povećanje proteinskog sadržaja kompleksa II, i blago povećanje kompleksa III i *cyt c*. Proteinski sadržaj kompleksa I i IV ostaje na nivou kontrolne grupe.

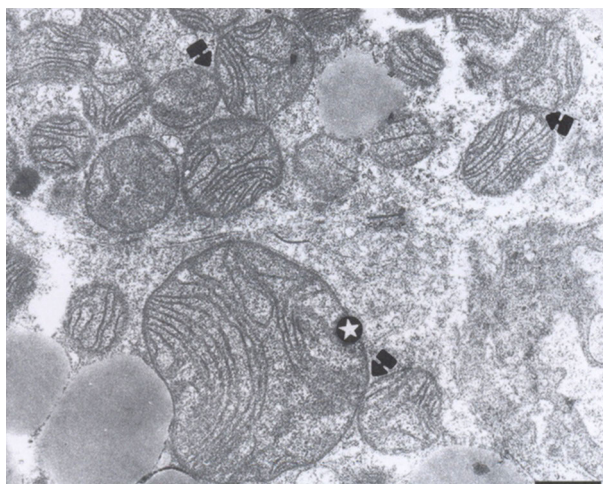
Hronični tretman insulinom, kako niskom tako i visokom dozom, indukuje smanjenje proteinskih sadržaja kompleksa I, kompleksa III i *cyt c*. Jedino je proteinski sadržaj kompleksa IV povećan, bez obzira na primjenjenu dozu insulina. Proteinska ekspresija kompleksa II je značajno povećana primjenom niske doze, a smanjena primjenom visoke doze insulina.

4.2.1.2 PROTEINSKA EKSPRESIJA ATP SINTAZE I IF₁

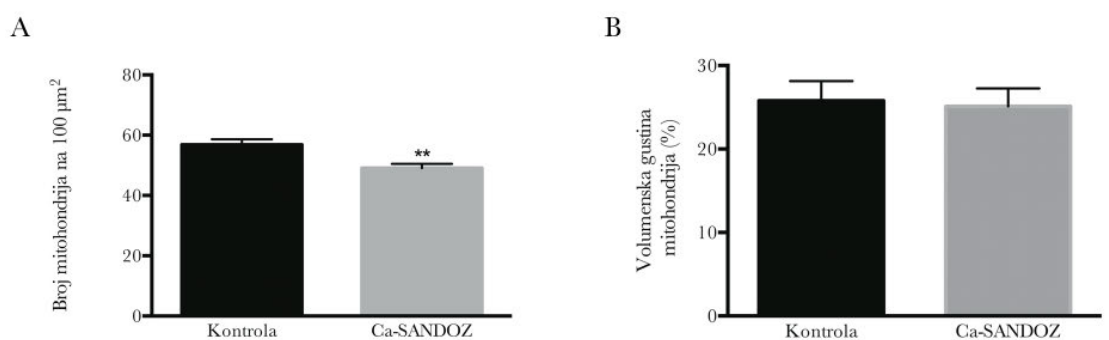
Akutni tretman insulinom značajno povećava proteinski sadržaj ATP sintaze i IF₁, nezavisno od primjenjene doze (Slika 27). Hronični tretman insulinom smanjuje proteinski sadržaj ATP sintaze, a povećava sadržaj IF₁ proteina (Slika 28), pri čemu je taj efekat izraženiji u grupi tretiranoj visokom dozom insulina.

4.2.1.3 PROTEINSKA EKSPRESIJA UCP₁, UCP₂ I UCP₃

Proteinski sadržaj dekuplujućih proteina, odnosno UCP₁, UCP₂ i UCP₃, u mitohondrijama bogatoj frakciji BAT određivan je poslije akutnog (Slika 29) i hroničnog (Slika



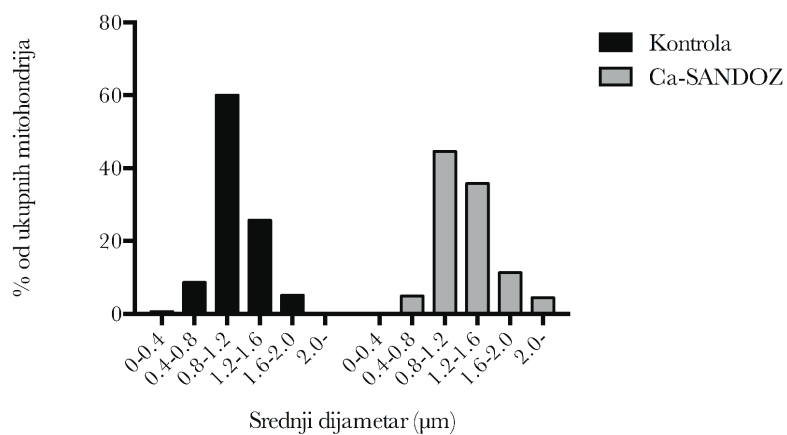
Slika 21. Megamitochondrije u Ca-SANDOZ grupi. Mrki adipocit sa megamitochondrijom (zvjezdica) i brojnim intermitochondrijalnim kontaktima (strelice). Bar: 1 μm .



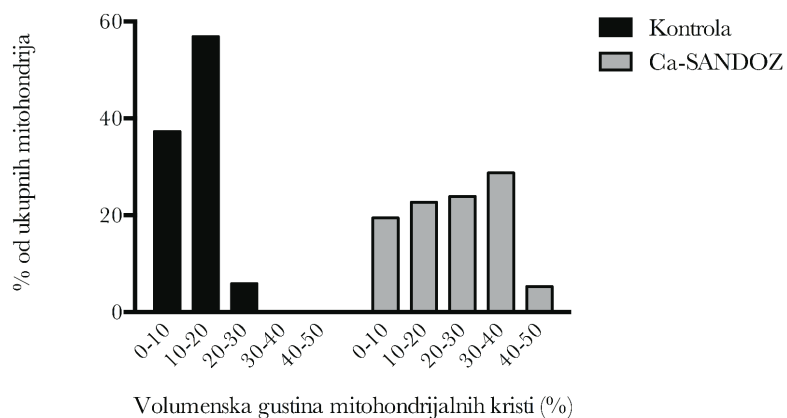
Slika 22. Stereološka analiza mitohondrija nakon Ca-SANDOZ tretmana. (A) Broj mitohondrija po jedinici površine mrkog adipocita; (B) volumenska gustina mitohondrija u mrkim adipocitima. * poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p \leq 0.01$.

30) tretmana niskom (0.4 IU), odnosno, visokom (4 IU) dozom insulina. Akutni tretman insulinom indukuje blago povećanje proteinskog sadržaja UCP2 proteina, ali i značajno povećanje proteinskog sadržaja UCP3 bez obzira na primjenjenu dozu. Proteinski sadržaj UCP1 je smanjen nakon primjene visoke doze insulina, a nepromjenjen nakon niske doze insulina.

Sa druge strane, hronični tretman značajno povećava proteinski sadržaj UCP1 proteina, i to obe doze, gdje je visoka doza efektivnija nego niska doza insulina. Isto tako, povećan je i proteinski sadržaj UCP3 proteina, ali više primjenom niske nego visoke doze insulina. Hronična niska doza insulina povećava proteinsku ekspresiju UCP2 proteina, i to u odnosu na kontrolu, ali i u odnosu na visoku dozu insulina, gdje je proteinski sadržaj smanjen u poređenju sa kontrolnom grupom (mada bez statističke značajnosti).



Slika 23. Distribucija mitohondrijalnih klasa po srednjem dijimetru nakon Ca-SANDOZ tretmana.

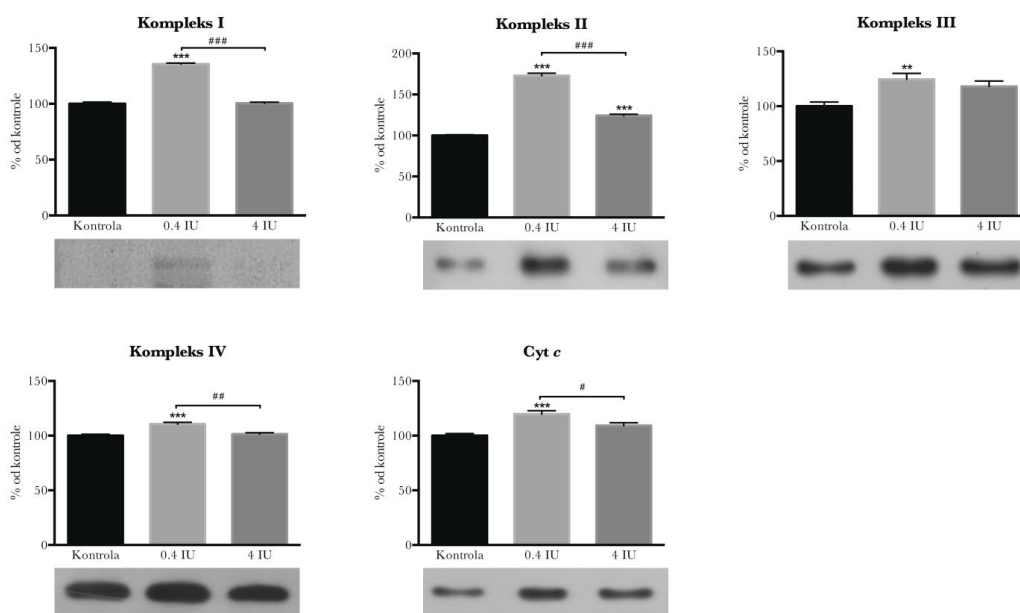


Slika 24. Distribucija mitohondrija po volumenskoj gustini kristi nakon Ca-SANDOZ tretmana.

4.2.1.4 PROTEINSKA EKSPRESIJA VDAC

Western blot analiza je pokazala da akutni tretman insulinom dovodi do značajnog povećanja proteinskog sadržaja VDAC u poređenju sa kontrolnom grupom, pri čemu je taj efekat značajniji u grupi tretiranoj niskom dozom insulina (Slika 31).

Isto tako, hronični tretman insulina dovodi do povećanja proteinskog sadržaja VDAC u odnosu na kontrolu, bez obzira na primjenjenu dozu (Slika 32).



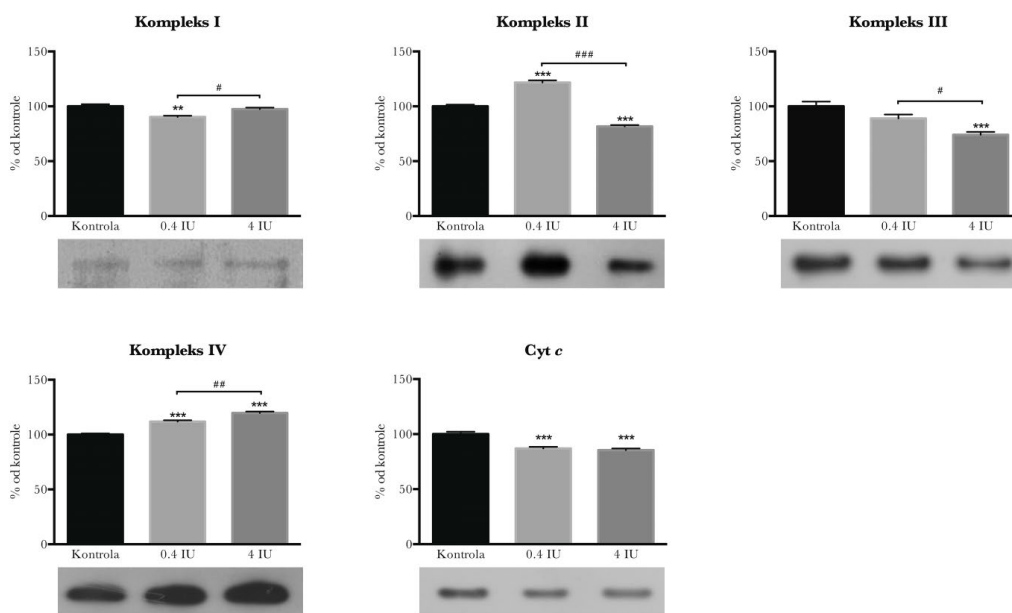
Slika 25. Promjena proteinske ekspresije kompleksa elektron transportnog lanca i cyt *c* nakon akutnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; # $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$.

4.2.2 WESTERN BLOT ANALIZA TKIVA

4.2.2.1 PROTEINSKA EKSPRESIJA KOMPLEKSA ELEKTRON TRANSPORTNOG LANCA I CYT C

Nivo proteinske ekspresije kompleksa elektron transportnog lanca u BAT određivan je poslije akutnog (Slika 33) i hroničnog (Slika 34) tretmana niskom (0.4 IU), odnosno visokom (4 IU) dozom insulina. Poslije akutnog tretmana niskom dozom insulina, ne dolazi do značajne promjene proteinskih sadržaja kompleksa I, IV i cyt *c* u odnosu na kontrolu. Ista doza vodi do značajnog smanjenja ekspresije kompleksa II, ali i kompleksa III. Visoka, akutna doza insulina, dovodi do značajnog smanjenja proteinskih sadržaja kompleksa I, kompleksa III i cyt *c*, a i dolazi do povećanja ekspresije kompleksa II. Ekspresija kompleksa IV ostaje nepromjenjen nakon primjene akutne visoke doze.

Sa druge strane, hronični tretman insulinom, bez obzira na dozu, dovodi do značajnog povećanja proteinske ekspresije kompleksa I i kompleksa IV u odnosu na kontrolu. Proteinski sadržaji kompleksa II, kompleksa III i cyt *c* ostaju nepromjenjeni primjenom niske doze. Tretman hroničnom, visokom dozom insulina dovodi do značajnog smanjenja proteinskih sadržaja kompleksa II i cyt *c*, a do povećanja u slučaju kompleksa III.



Slika 26. Promjena proteinske ekspresije kompleksa elektron transportnog lanca i *cyt c* nakon hroničnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; # $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$.

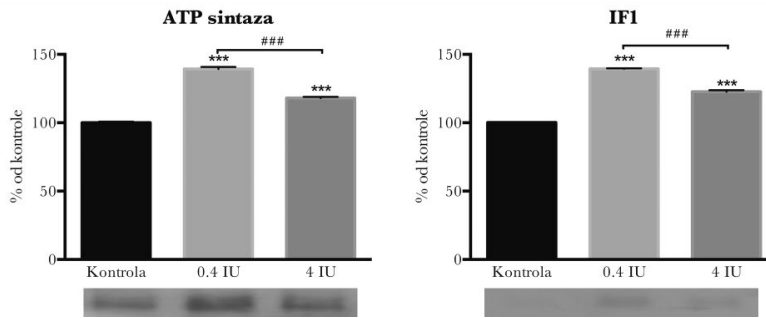
4.2.2.2 PROTEINSKA EKSPRESIJA ATP SINTAZE I IF1

U poređenju sa kontrolnom grupom, akutni tretman insulinom značajno smanjuje proteinski sadržaj ATP sintaze i IF1, nezavisno od primjenjene doze (Slika 35). Sličan obrazac proteinske ekspresije se uočava i nakon hroničnog tretmana insulinom (Slika 36).

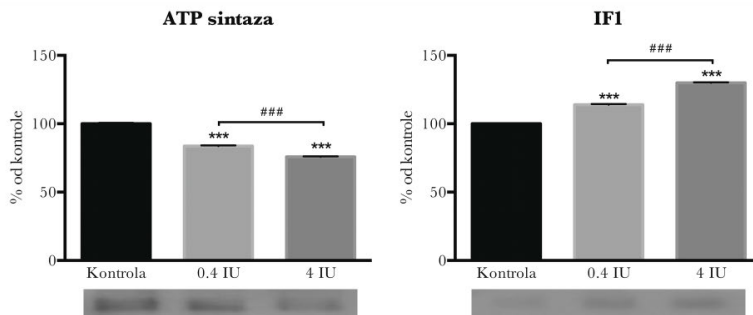
4.2.2.3 PROTEINSKA EKSPRESIJA UCP1 I UCP2

U poređenju sa kontrolom dolazi do značajnog smanjenja proteinskog sadržaja UCP1 nakon primjene akutnog tretmana insulinom (Slika 37), i to obe doze. UCP2 je isto smanjen, ali značajnije u slučaju akutne, niske doze insulina.

U poređenju sa kontrolom, hronični tretman insulinom (Slika 38) dovodi do značajnog povećanja proteinskog sadržaja UCP1 proteina, pogotovo nakon primjene visoke doze. Trend smanjivanja ekspresije UCP2 ide u pravcu povećanja doze, ali bez statističke značajnosti.



Slika 27. Promjena proteinske ekspresije ATP sintaze i IF1 nakon akutnog tretmana insulinom. * poredenje sa kontrolnom grupom; *** $p \leq 0.001$. # poredenje između 0.4 IU i 4 IU; ### $p \leq 0.001$.



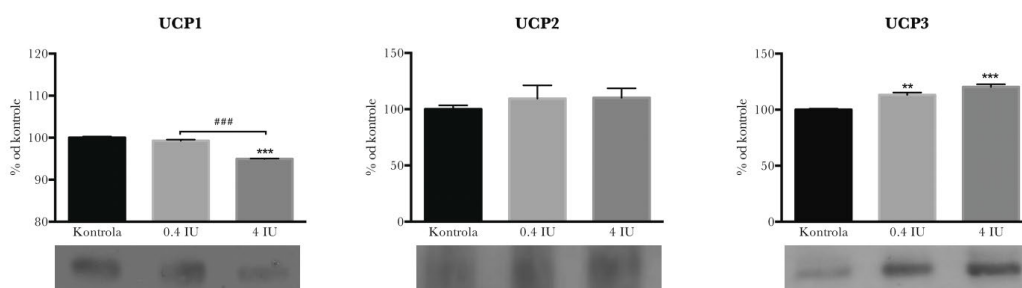
Slika 28. Promjena proteinske ekspresije ATP sintaze i IF1 nakon hroničnog tretmana insulinom. * poredenje sa kontrolnom grupom; *** $p \leq 0.001$. # poredenje između 0.4 IU i 4 IU; ### $p \leq 0.001$.

4.2.2.4 PROTEINSKA EKSPRESIJA VDAC

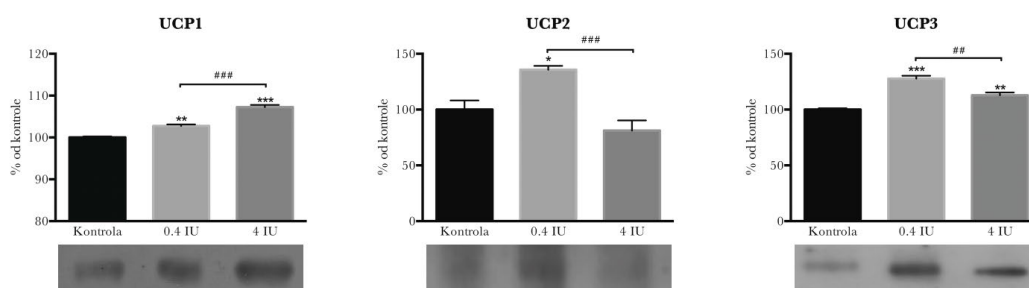
Akutni tretman insulinom, u poređenju sa kontrolom, dovodi do smanjenja proteinskog sadržaja VDAC, ali taj efekat je značajniji nakon primjene visoke doze (Slika 39). Hronični tretman insulinom indukuje značajno smanjenje proteinske ekspresije VDAC i to u slučaju obe doze (Slika 40).

4.2.2.5 PROTEINSKA EKSPRESIJA KATALAZE

Nakon tretmana objema dozama insulina, a naročito niska doza dovodi do značajne indukcije proteinskog sadržaja katalaze (Slika 41), u poređenju sa kontrolnom grupom. Sa druge strane, hronični tretman insulinom dovodi do pada proteinske ekspresije katalaze, gdje je taj efekat izraženiji u grupi sa visokom dozom insulina (Slika 42).



Slika 29. Promjena proteinske ekspresije UCP₁, UCP₂ i UCP₃ nakon akutnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; ### $p \leq 0.001$.



Slika 30. Promjena proteinske ekspresije UCP₁, UCP₂ i UCP₃ nakon hroničnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$.

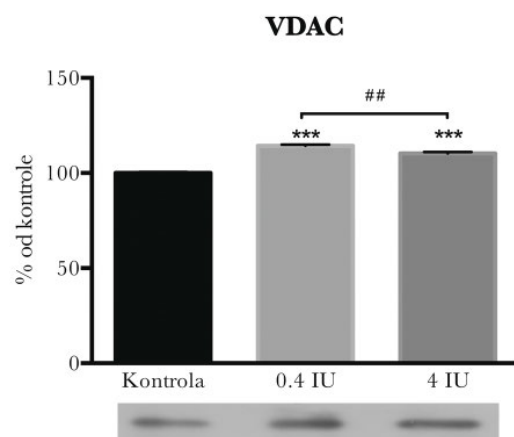
4.2.2.6 PROTEINSKA EKSPRESIJA KALNEKSINA

Do blagog, ali značajnog pada proteinskog sadržaja kalneksina, u poređenju sa kontrolnom grupom, dolazi primjenom akutnog tretmana insulinom, i to obe doze (Slika 43). Hronični tretman dovodi do značajnog povećanja proteinske ekspresije kalneksina, ali efekat je izraženiji primjenom visoke doze (Slika 44).

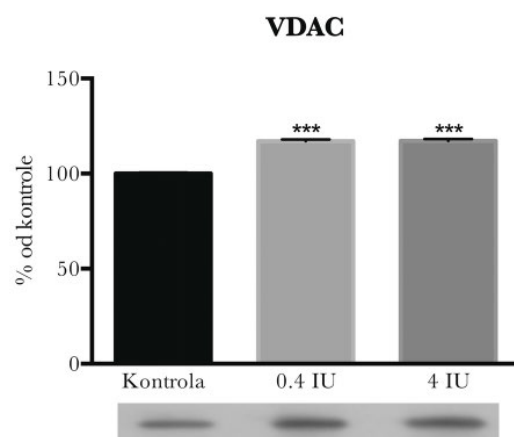
4.2.3 BIOHEMIJSKA ANALIZA

4.2.3.1 AKTIVNOST ATP SINTAZE

Mjerenje aktivnosti ATP sintaze pokazuje da akutni tretman insulinom dovodi do povećanja relativne aktivnosti ATP sintaze u poređenju sa kontrolnom grupom, gdje je efekat izražen primjenom visoke doze insulina (Slika 45). Sa druge strane, hronični tretman insulinom

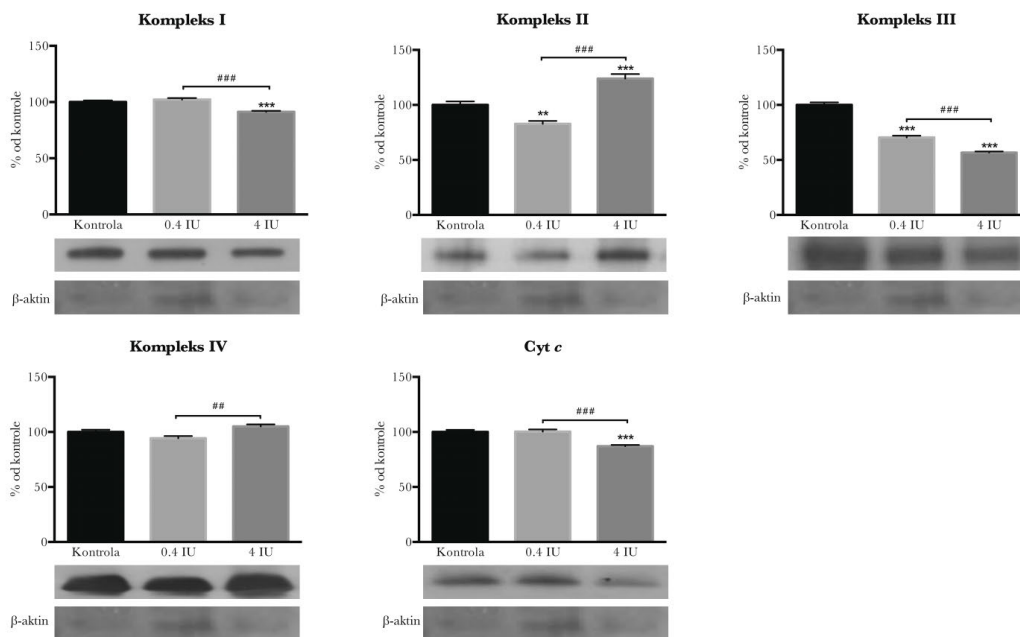


Slika 31. Promjena proteinske ekspresije VDAC nakon akutnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; ## $p \leq 0.01$.

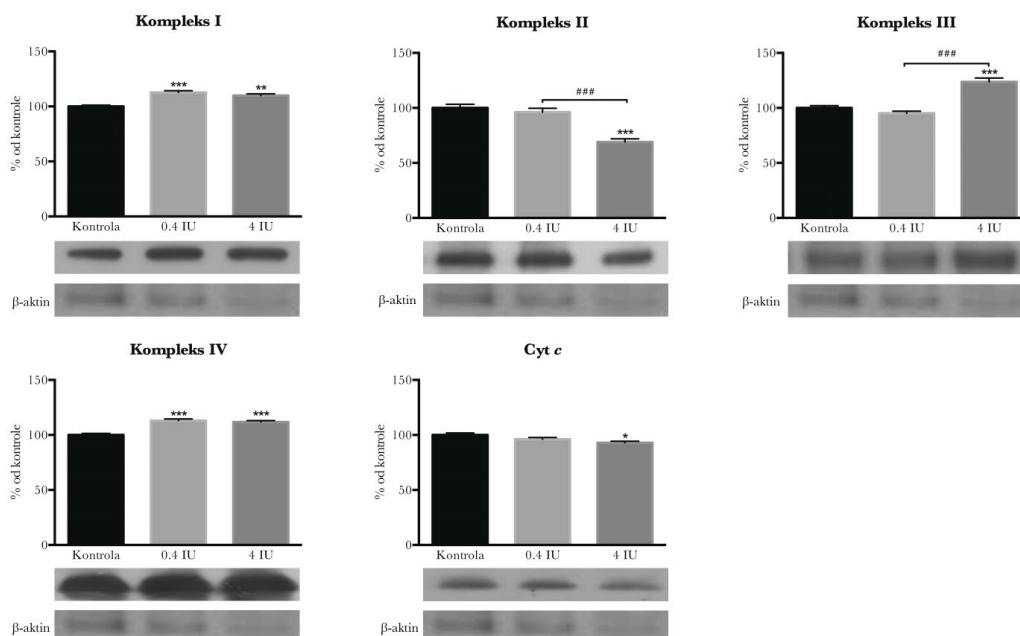


Slika 32. Promjena proteinske ekspresije VDAC nakon hroničnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p \leq 0.001$.

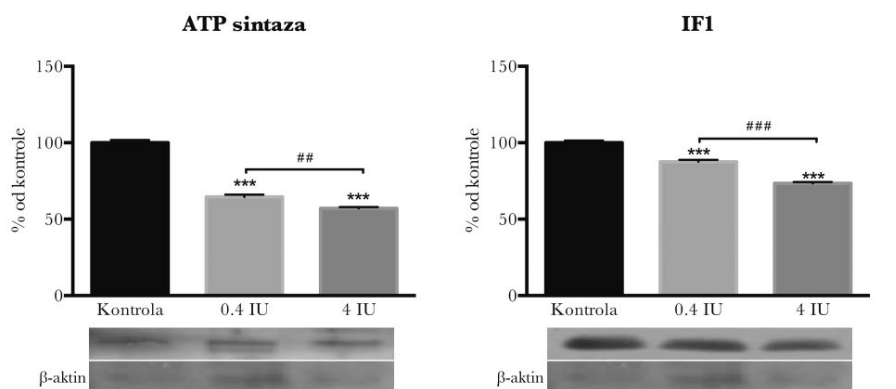
dovodi do smanjenja relativne aktivnosti ATP sintaze u dozno zavisnom maniru (Slika 45).



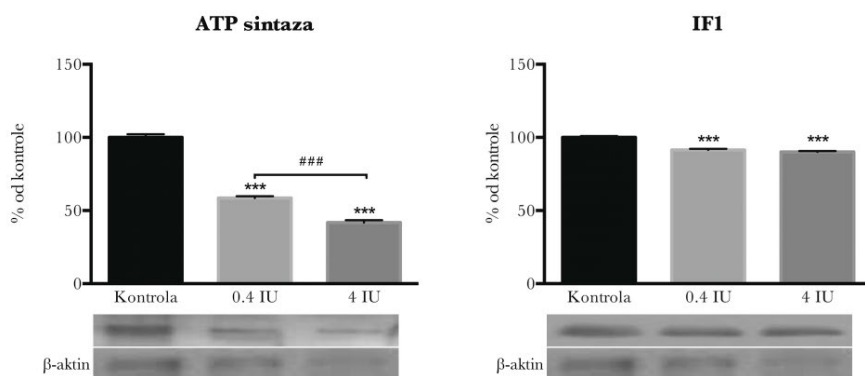
Slika 33. Promjena proteinske ekspresije kompleksa elektron transportnog lanca nakon akutnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$.



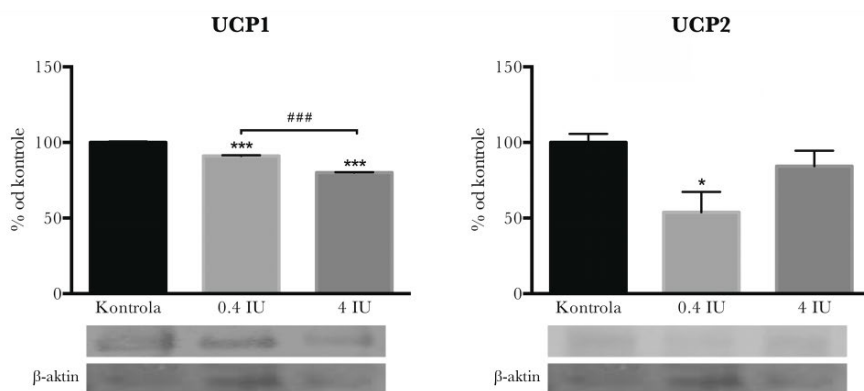
Slika 34. Promjena proteinske ekspresije kompleksa elektron transportnog lanca nakon hroničnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; ### $p \leq 0.001$.



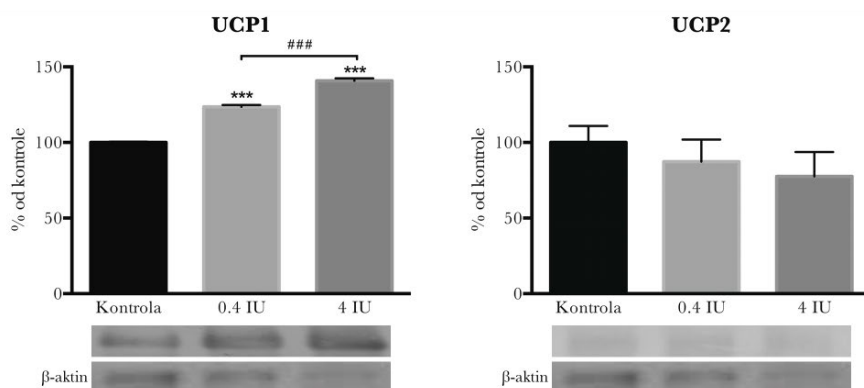
Slika 35. Promjena proteinske ekspresije ATP sintaze i IF1 nakon akutnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$.



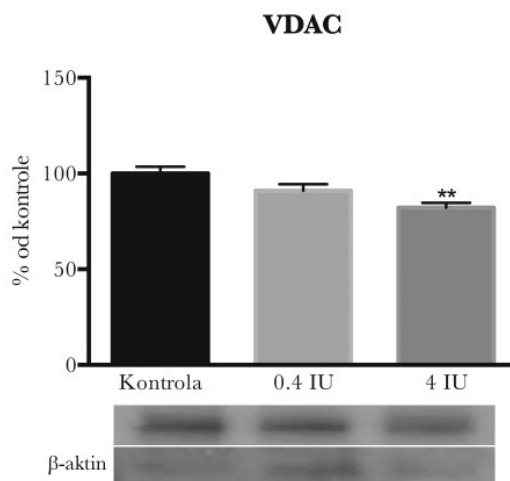
Slika 36. Promjena proteinske ekspresije ATP sintaze i IF1 nakon hroničnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; ### $p \leq 0.001$



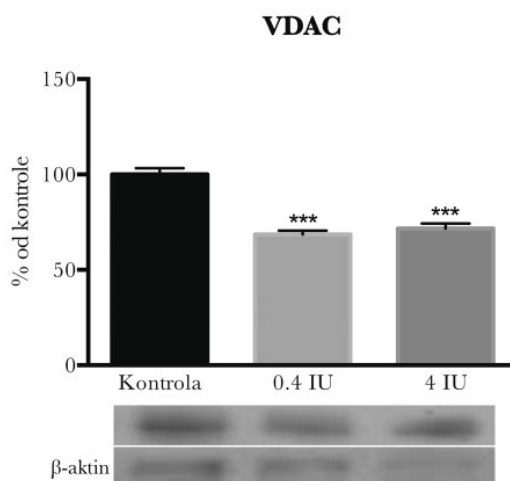
Slika 37. Promjena proteinske ekspresije UCP1 i UCP2 nakon akutnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; ### $p \leq 0.001$



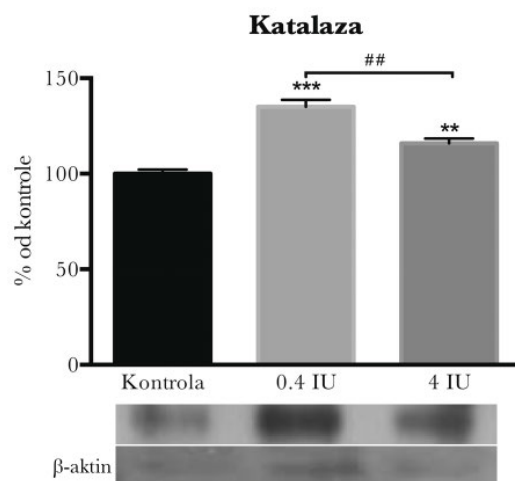
Slika 38. Promjena proteinske ekspresije UCP1 i UCP2 nakon hroničnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; ### $p \leq 0.001$



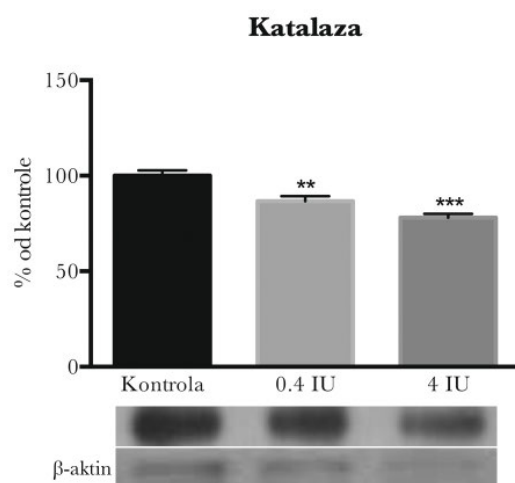
Slika 39. Promjena proteinske ekspresije VDAC nakon akutnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p \leq 0.01$.



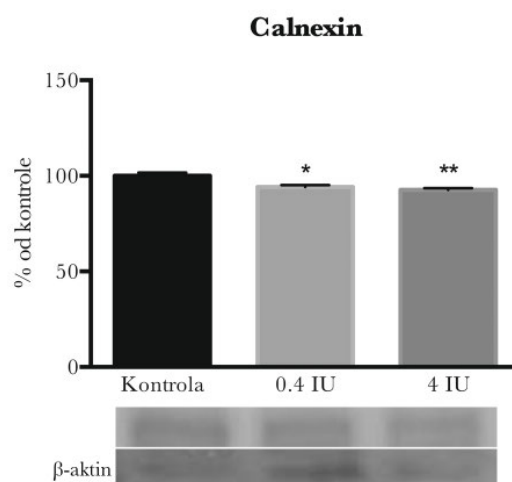
Slika 40. Promjena proteinske ekspresije VDAC nakon hroničnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p \leq 0.001$.



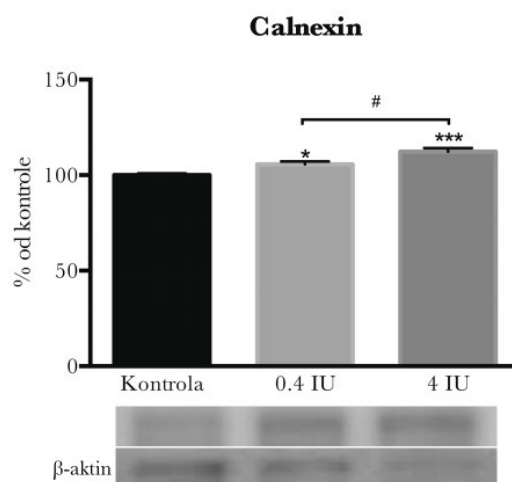
Slika 41. Promjena proteinske ekspresije katalaze nakon akutnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; ## $p \leq 0.01$



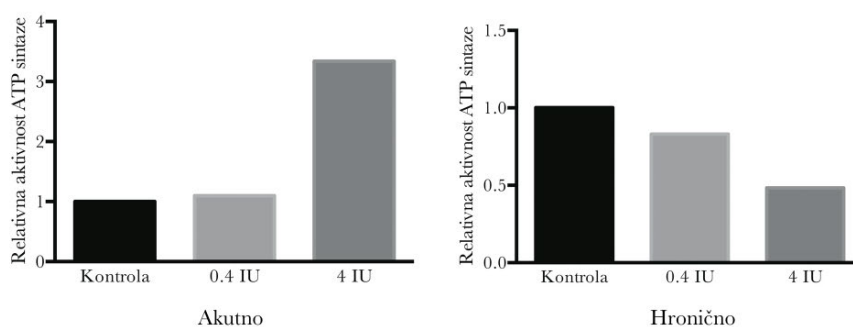
Slika 42. Promjena proteinske ekspresije katalaze nakon hroničnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.



Slika 43. Promjena proteinske ekspresije kalneksina nakon akutnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.



Slika 44. Promjena proteinske ekspresije kalneksina nakon hroničnog tretmana insulinom. * poređenje sa kontrolnom grupom; * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$. # poređenje između 0.4 IU i 4 IU; # $p \leq 0.05$.

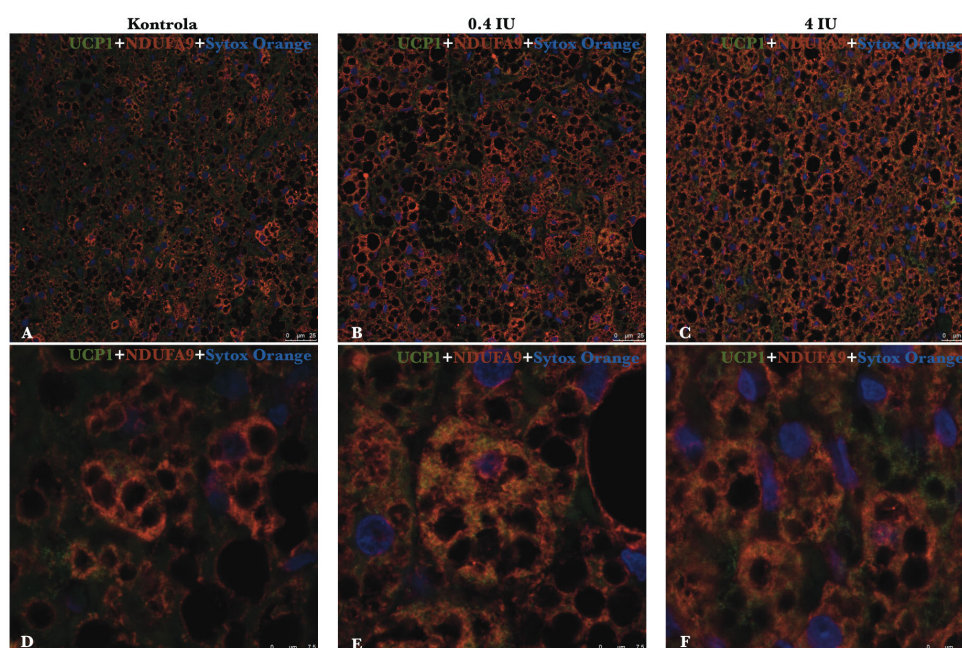


Slika 45. Relativna aktivnost ATP sintaze nakon akutnog i hroničnog tretmana insulinom. ATP sintazna aktivnost je normalizovana u odnosu na odgovarajuću kontrolu.

4.2.4 MIKROSKOPSKE ANALIZE

4.2.4.1 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA KOMPLEKSA I I UCP₁

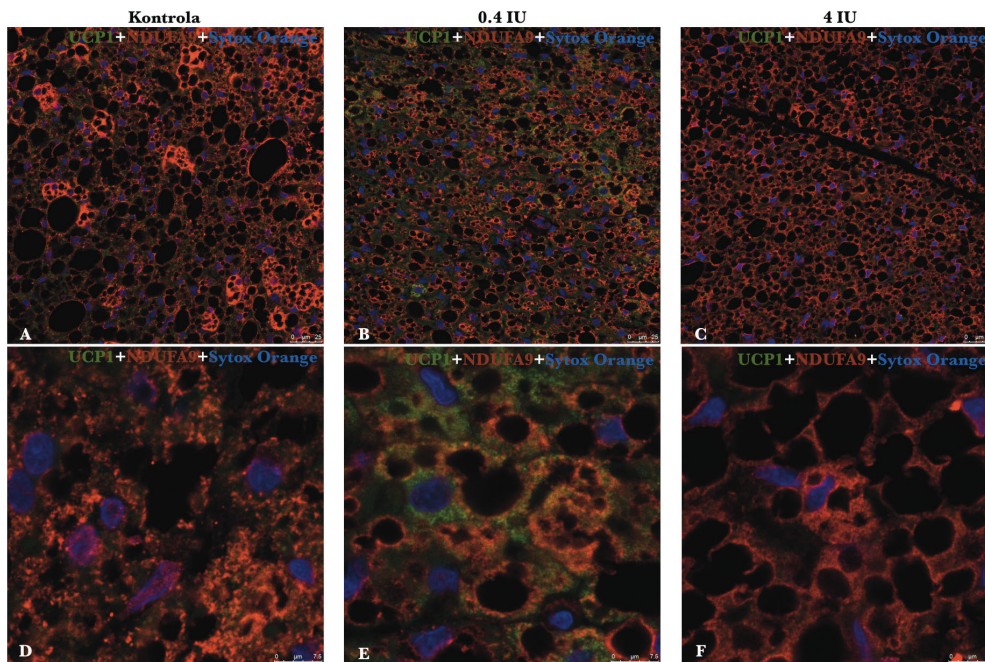
Radi utvrđivanja potencijalne udružene lokalizacije (kolokalizacije) bioenergetskih i termogenih proteina mitohondrija u BAT, analizirana je imunoekspresija i specifična lokalizacija kompleksa I elektron transportnog lanca i UCP₁ na nivou konfokalne mikroskopije, nakon akutnog (Slika 46) i hroničnog (Slika 47) tretmana niskom (0.4 IU) i visokom (4 IU) dozom insulina.



Slika 46. Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa I i UCP₁ nakon akutnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija na UCP₁ (zeleno) i kompleks I (crveno). Jedra su obojena Sytox Orange (plavo). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).

Mrki adipociti u kontrolnim grupama pokazuju jasnu heterogenu imunoekspresiju kompleksa I i UCP₁, što je već poznato u literaturi kao Harlekin efekat, koja se gubi nakon tretmana insulinom i uočava se jaka, homogena imunoekspresija kod većine mrkih adipocita. Fluorescencija se uočava u mitohondrijama. U zavisnosti od imunoekspresije uočava se nekoliko tipova mrkih adipocita. Pojedini mrki adipociti se odlikuju dominacijom ekspresije UCP₁ ili kompleksa I, dok u drugima potpuno odsustvuje UCP₁, a neki iskazuju jasnu kolokalizaciju oba proteina.

UCP₁-imunopozitivne mitohondrije su uglavnom lokalizovane u citoplazmi zrelih mrkih adipocita. Sitniji, manje zreli mrki adipociti pokazuju slabiju UCP₁ imunoekspresiju u odnosu



Slika 47. Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa I i UCP1 nakon hroničnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija na UCP1 (*zeleno*) i kompleks I (*crveno*). Jezra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 25 µm (A-C), 7.5 µm (D-F).

na susjedne, krupnije mrke adipocite.

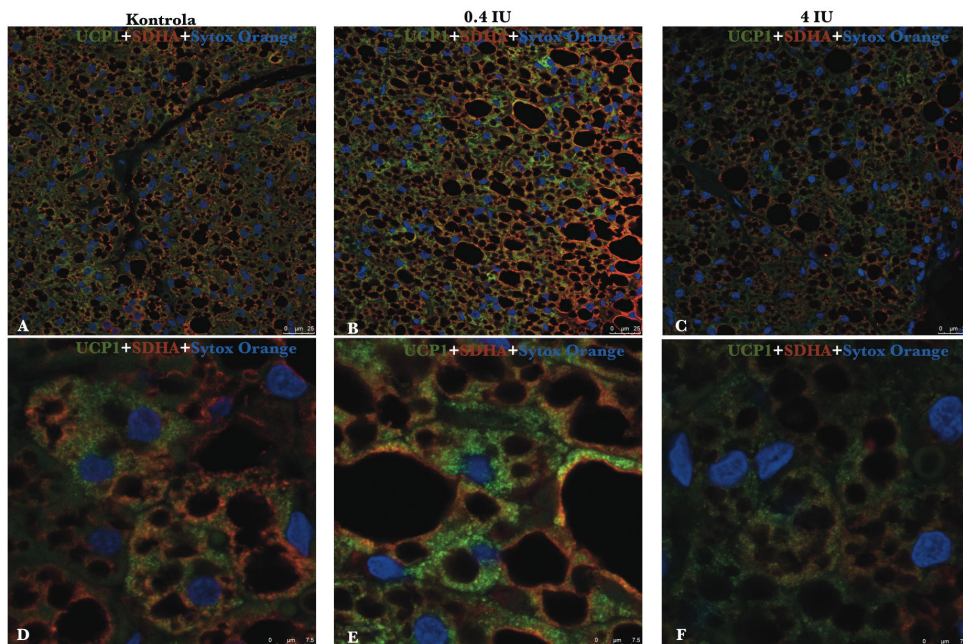
Sa druge strane, kompleks I-imunopozitivne mitohondrije su lokalizovane oko nukleusa i oko lipidnih tijela, gdje su jasno uočene u vidu mitohondrijalnih klastera u nekim mrkim adipocitima. Uočavaju se i pojedini adipociti slični adipocitima WAT koji su rasuti po BAT, i pokazuju jaču imunofluorescenciju kompleksa I, i to oko lipidnih tijela.

4.2.4.2 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA KOMPLEKSA II I UCP1

U slučaju kompleksa II i UCP1, analizirala se njihova imunofluorescentna lokalizacija pod djelovanjem akutnog (Slika 48) i hroničnog (Slika 49) tretmana niskom (0.4 IU) i visokom (4 IU) dozom insulina.

Mrki adipociti kontrolne grupe pokazuju jasnu heterogenu imunolokalizaciju kompleksa II i UCP1 (Harlekin efekat) i taj efekat se gubi zbog homogenizacije među mrkim adipocitima primjenom insulina. Fluorescencija se uočava u nivou mitohondrija. Neki mrki adipociti pokazuju dominantnu imunofluorescenciju na UCP1, drugi dominantnu imunofluorescenciju na kompleks II, a neki jasnu kolokalizaciju UCP1 i kompleksa II.

Manje zreli adipociti pokazuju slabiju UCP1 imunofluorescenciju u odnosu na krupnije



Slika 48. Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa II i UCP₁ nakon akutnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP₁ (zeleno) i kompleks II (crveno). Jedra su obojena Sytox Orange (plavo). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).

mrke adipocite.

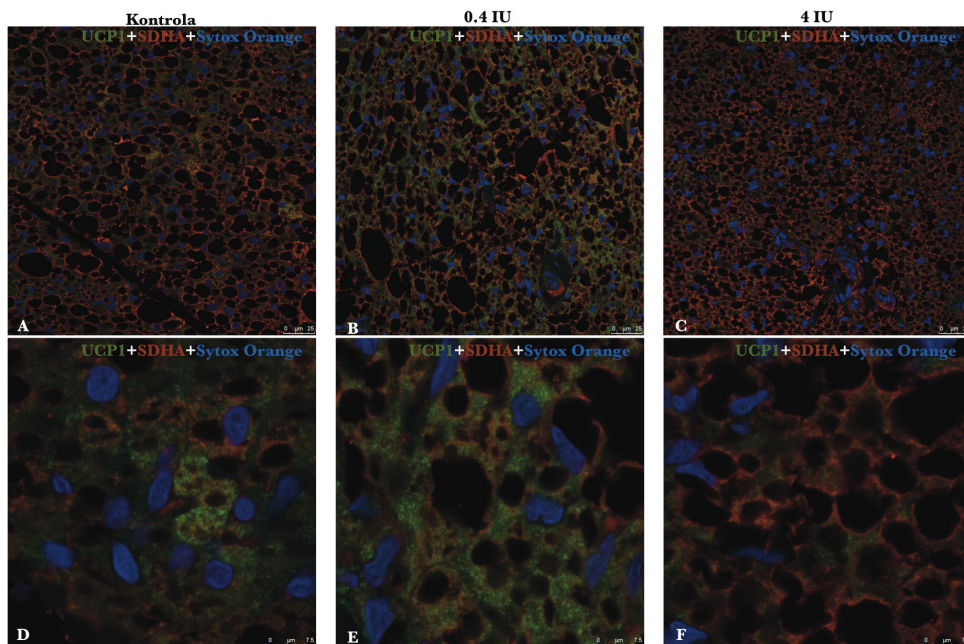
Kompleks II-imunopozitivne mitohondrije su lokalizovane oko nukleusa i lipidnih tijela. Osim toga, uočava se jasna imunolokalizacija kompleksa II i UCP₁ u mitohondrijama oko lipidnih tijela. Što se tiče adipocita sličnih adipocitima WAT, oko lipidnih tijela se uočava jasna imunofluorescencija kompleksa II.

4.2.4.3 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA KOMPLEKSA III I UCP₁

Imunofluorescentna analiza kompleksa III i UCP₁ u BAT životinja tretiranih akutno (Slika 50) odnosno hronično (Slika 51) niskom (0.4 IU) i visokom (4 IU) dozom insulina; pokazuje jasnu heterogenu imunoekspresiju kompleksa III i UCP₁. Ta heterogenost se gubi uslijed homogenizacije među mrkim adipocitima nakon tretmana insulinom.

Imunofluorescencija kompleksa III i UCP₁ se uočava u mitohondrijama. Uočava se heterogenost mrkih adipocita, odnosno jedni se odlikuju imunofluorescencijom uglavnom UCP₁, drugi uglavnom kompleksa III, a treći jasnom kolokalizacijom i UCP₁ i kompleksa III. Ta kolokalizacija se jasno uočava u akutnoj grupi sa niskom dozom insulina (Slika 50B, E).

UCP₁-pozitivne mitohondrije su homogeno raspoređene u citoplazmi, dok kompleks



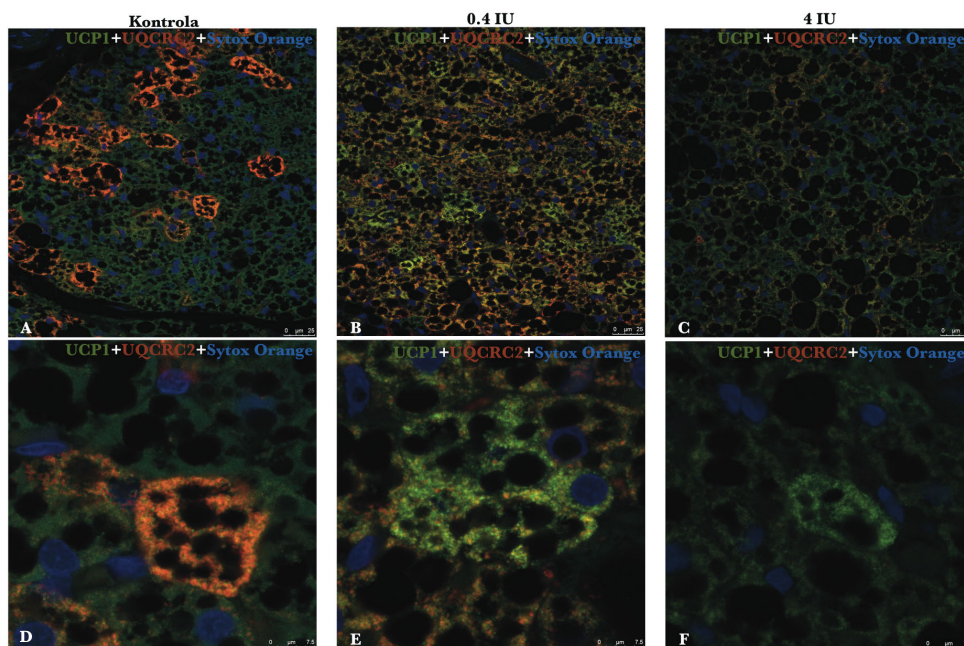
Slika 49. Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa II i UCP1 nakon hroničnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP1 (*zeleno*) i kompleks II (*crveno*). Jedra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 25 µm (A-C), 7.5 µm (D-F).

III-pozitivne mitohondrije se jasnije uočavaju oko lipidnih tijela i oko nukleusa. Krupni i zreli mrki adipociti pokazuju jaču imunofluorescenciju UCP1 proteina, u odnosu na susjedne, sitnije, nezrele mrke adipocite. Kompleks III-pozitivne mitohondrije se takođe uočavaju oko lipidnih tijela u adipocitima slični adipocitima WAT.

4.2.4.4 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA KOMPLEKSA IV I UCP1

Imunofluorescentna analiza kompleksa IV i UCP1 BAT nakon akutnog (Slika 52) i hroničnog (Slika 53) tretmana insulinom pokazuje imunofluorescenciju UCP1 proteina, a i kompleksa IV. Oba proteina su lokalizovane u mitohondrijama. Heterogenost mrkih adipocita se uočava u svim grupama. Takođe se uočava kolokalizacija kompleksa IV i UCP1 u većini mrkih adipocita.

UCP1-pozitivne mitohondrije su relativno ravnomjerno raspoređene u citoplazmi mrkih adipocita, ali se i uočava klasterizacija mitohondrija oko lipidnih tijela u kojima se detektuje kolokalizacija kompleksa IV i UCP1.



Slika 50. Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa III i UCP₁ nakon akutnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP₁ (*zeleno*) i kompleks III (*crveno*). Jedra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 25 µm (A-C), 7.5 µm (D-F).

4.2.4.5 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA CYT *c* I UCP₁

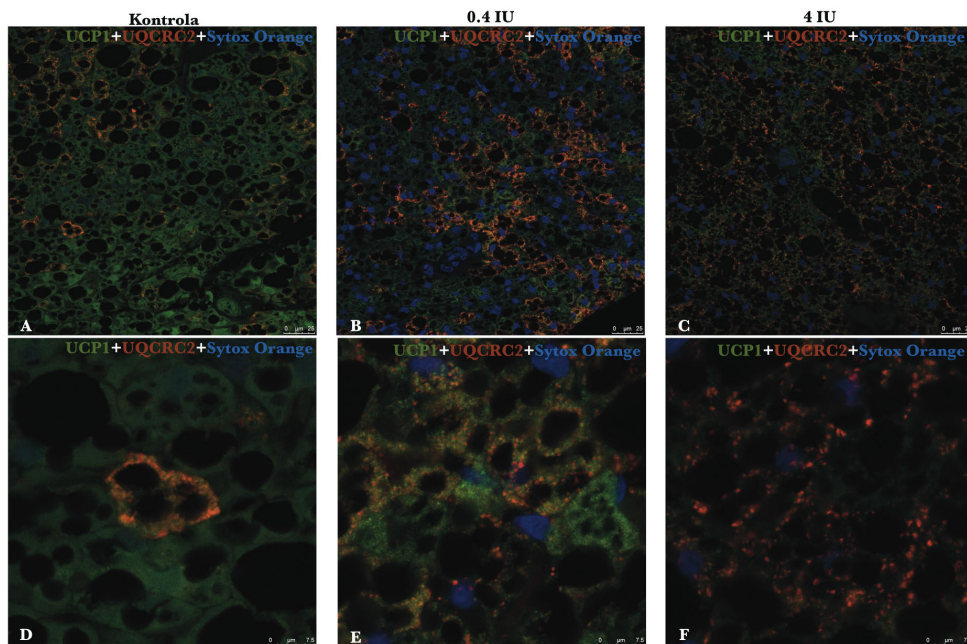
Analizirana je imunoekspresija i specifična lokalizacija *cyt c* i UCP₁ primjenom konfokalne mikroskopije nakon akutnog (Slika 54) i hroničnog (Slika 55) tretmana niskom (0.4 IU) i visokom (4 IU) dozom insulina.

U kontrolnim grupama se jasno uočava heterogena ekspresija *cyt c* i UCP₁. Razlikuju se mrki adipociti sa dominantnom imunoekspresijom UCP₁, mrki adipociti sa dominantnom ekspresijom *cyt c*, ali i mrki adipociti sa jasnom kolokalizacijom *cyt c* i UCP₁. Oba analizirana proteina se uočavaju u mitohondrijama.

UCP₁-pozitivne mitohondrije se uočavaju svuda u citoplazmi, dok su mitohondrije sa dominantnom imunoekspresijom *cyt c* uočene oko lipidnih tijela. Oko lipidnih tijela, u mitohondrijalnim klasterima, uočava se kolokalizacija *cyt c* i UCP₁ proteina.

4.2.4.6 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA ATP SINTAZE I UCP₁

Analizirana je imunoekspresija ATP sintaze i UCP₁ na BAT pacova tretiranih akutno (Slika 56), odnosno hronično (Slika 57) niskom (0.4 IU) i visokom (4 IU) dozom insulina. Mrki adipociti, pogotovo u kontrolnim grupama, pokazuju heterogenost imunoekspresije ATP



Slika 51. Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa III i UCP₁ nakon hroničnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP₁ (zeleno) i kompleks III (crveno). Jedra su obojena Sytox Orange (plavo). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).

sintaze, odnosno UCP₁ proteina.

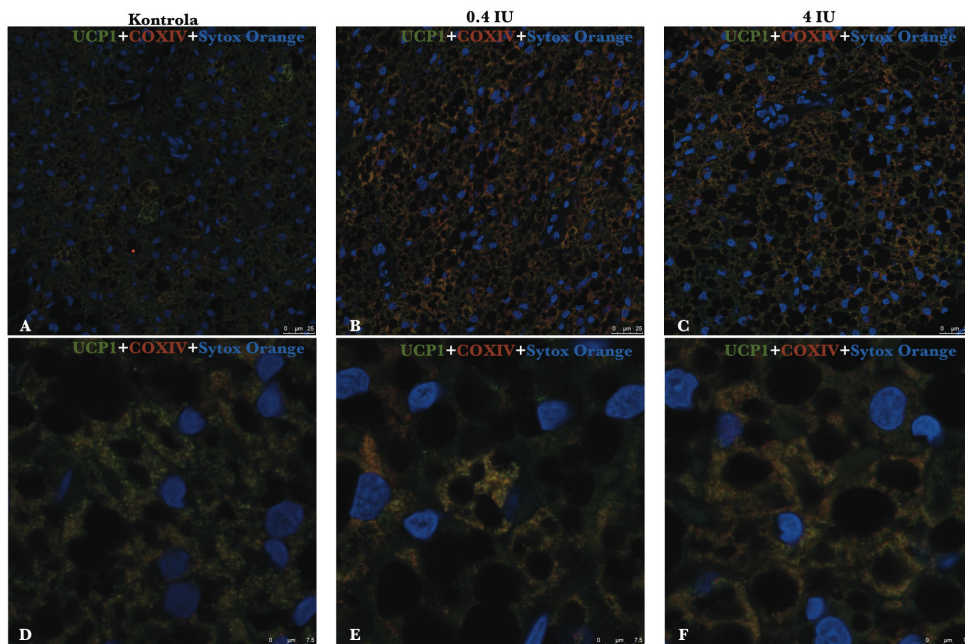
Akutni tretman niskom i visokom dozom insulina doveo je do vidljive heterogenosti imunoekspresije ATP sintaze i UCP₁. Detaljnije se uočava da su ATP sintaza i UCP₁ protein lokalizovani u mitohondrijama mrkih adipocita. Štaviše, uočava se i jasna i isključiva imunolokalizacija ATP sintaze u mrkim adipocitima sa većim lipidnim tijelima, u odnosu na susjedne mrke adipocite, koji pokazuju mitohondrije sa kolokalizacijom ova dva proteina, ali i većinu mitohondrija sa dominantnom ekspresijom UCP₁ (Slika 58).

BAT hronično tretiranih životinja pokazuje prisustvo heterogenosti imunoekspresije ATP sintaze i UCP₁.

4.2.4.7 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA IF₁ I UCP₁

Analizirana je imunofluorescentna lokalizacija IF₁ i UCP₁ u mrkim adipocitima pacova tretiranih akutno (Slika 59) i hronično (Slika 60) niskom (0.4 IU), odnosno visokom (4 IU) dozom insulina.

U akutno tretiranim kontrolnim grupama, uočava se heterogenost imunolokalizacije IF₁,



Slika 52. Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa IV i UCP1 nakon akutnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP1 (*zeleno*) i kompleks IV (*crveno*). Jedra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 25 µm (A-C), 7.5 µm (D-F).

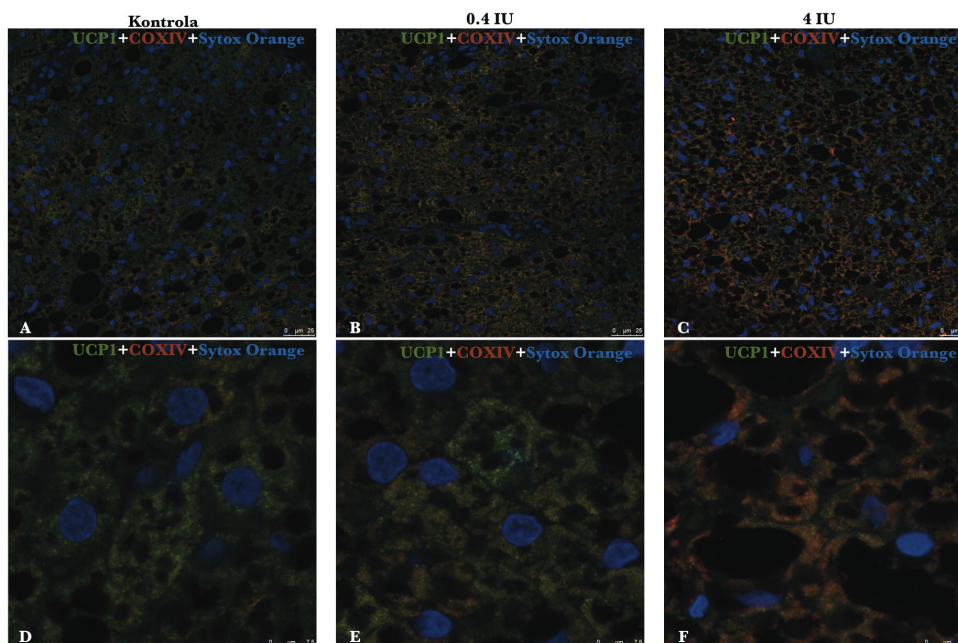
odnosno UCP1. Heterogenost njihove ekspresije se gubi pod djelovanjem insulinskog tretmana. Neki preadipociti ne pokazuju imunofluorescenciju na UCP1 protein (Slika 59D), dok mitohondrije mrkih adipocita međusobno pokazuju velike razlike u imunoekspresiji UCP1 i IF1, čak i kod istog mrkog adipocita, dok se kod većine uočava i kolokalizacija ova dva proteina.

Hronično tretirane grupe pokazuju sličnu heterogenost imunolokalizacije IF1 i UCP1, ali se uočava i postepeno povećanje imunofluorescencije IF1 proteina sa povećanjem doze insulina u odnosu na odgovarajuću kontrolu (Slika 60).

4.2.4.8 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA KOMPLEKSA III I IV

Rezultati analize kolokalizacije mitohondrijalnih kompleksa – kompleksa III i kompleksa IV, u BAT nakon akutnog, odnosno hroničnog tretmana niskom (0.4 IU) i visokom (4 IU) dozom insulina prikazani su na Slici 61, tj. Slici 62.

Uočena je imunolokalizacija kompleksa III i IV u mitohondrijama, pri čemu je najveća gustina ovih mitohondrija oko lipidnih tijela. Kontrolne grupe se odlikuju heterogenošću imunoekspresije kompleksa III i IV, odnosno uočavaju se mrki adipociti sa različitim nivoom imunofluorescencije. Čak su prisutni i mrki adipociti bez imunofluorescentne lokalizacije



Slika 53. Imunofluorescentna lokalizacija kompleksa IV i UCP1 nakon hroničnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP1 (*zeleno*) i kompleks IV (*crveno*). Jedra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).

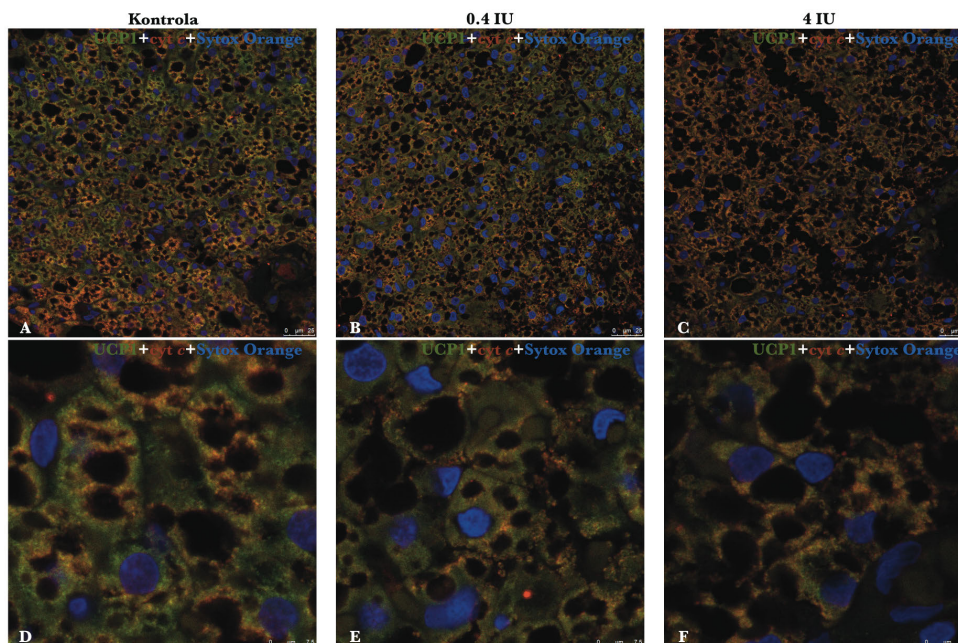
navedenih kompleksa. Kolokalizovane mitohondrije su uglavnom pozicionirane oko lipidnih tijela.

Nakon akutnog tretmana insulinom gubi se heterogenost među mrkim adipocitima u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Niska doza insulina stimuliše mitohondrijalnu heterogenost, tj. razlikuju se mitohondrije sa dominantnom ekspresijom kompleksa III, mitohondrije sa dominantnom ekspresijom kompleksa IV, i mitohondrije sa jasnom kolokalizacijom oba kompleksa. Mitohondrije sa jasnom kolokalizacijom su uglavnom prisutne oko nukleusa, i ponegdje oko lipidnih tijela (Slika 61E). Kompleks III-dominantne mitohondrije se mogu naći ravnomjerno u citoplazmi i ponegdje oko lipidnih tijela, a kompleks IV-dominantne mitohondrije su češće oko lipidnih tijela. Visoka doza uglavnom održava kolokalizaciju oba kompleksa u mitohondrijama oko lipidnih tijela.

Hronični tretman insulinom dovodi do gubitka heterogenosti mrkih adipocita uslijed pojave jake homogene reakcije u većini mrkih adipocita. U ovim grupama se uočavaju preadipociti sa jasnom dominacijom imunoekspresije kompleksa IV (Slika 62E).

4.2.4.9 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA ATP SINTAZE I IF1

Analizirana je zajednička imunofluorescentna lokalizacija ATP sintaze i IF1 u BAT pacova tretiranih akutno (Slika 63) i hronično (Slika 64) niskom (0.4 IU), odnosno visokom (4 IU)



Slika 54. Imunofluorescentna lokalizacija *cyt c* i UCP1 nakon akutnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP1 (zeleno) i *cyt c* (crveno). Jedra su obojena Sytox Orange (plavo). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).

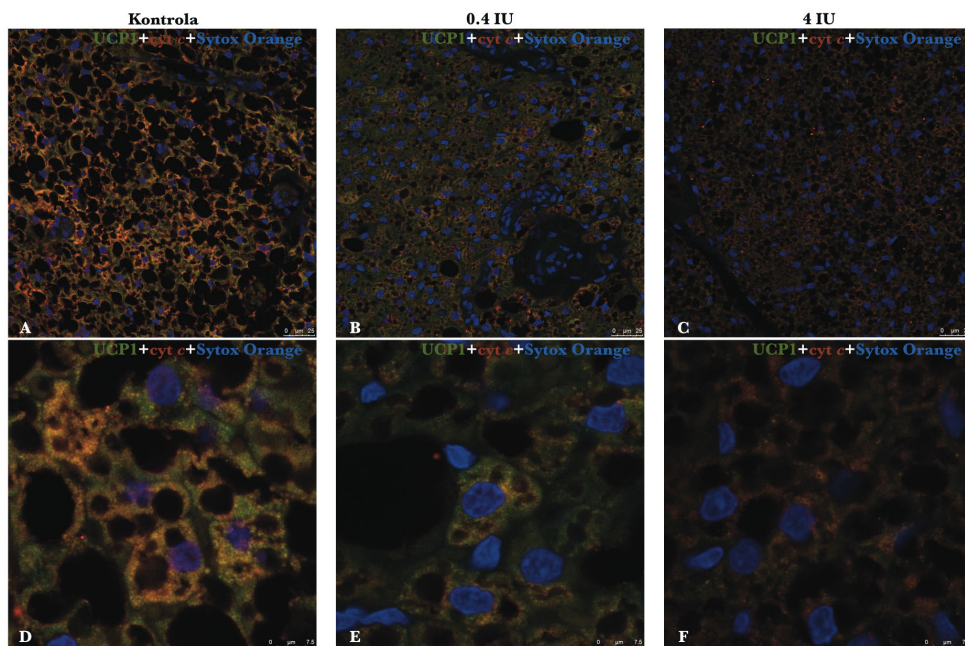
dozom insulina. Imunofluorescencija pokazuje jasnu kolokalizaciju ATP sintaze i IF1 u mitohondrijama mrkih adipocita, bez obzira na dužinu tretmana i primjenjenu dozu insulina. Isti obrazac se uočava i u kontrolnim grupama.

4.2.4.10 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA VDAC I KALNEKSINA

Rezultati imunofluorescentne analize VDAC, proteina koji se nalazi u spoljašnjoj membrani mitohondrija, i kalneksina, integralnog proteina ER, i to na BAT životinja tretiranih akutnom, odnosno hroničnom niskom (0.4 IU) i visokom (4 IU) dozom insulina prikazani su na Slici 65 i Slici 66.

U kontrolnoj grupi akutno tretiranih životinja uočava se heterogenost mrkih adipocita kad je u pitanju imunoekspresija VDAC i kalneksina. VDAC se lokalizuje u mitohondrijama, dok je kalneksin više prisutan u citoplazmi (ER). Jasno se uočava i kolokalizacija VDAC i kalneksina uz mitohondrije. Ta kolokalizacija je izraženija nakon primjene niske doze insulina.

Pri hroničnom tretmanu, i kontrola pokazuje heterogenost mrkih adipocita u imunoekspresiji VDAC i kalneksina. U grupi tretiranoj niskom dozom insulina ta kolokalizacija



Slika 55. Imunofluorescentna lokalizacija cyt *c* i UCP1 nakon hroničnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP1 (zeleno) i cyt *c* (crveno). Jedra su obojena Sytox Orange (plavo). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).

je nešto slabije izražena, ali se povećava sa povećanjem doze.

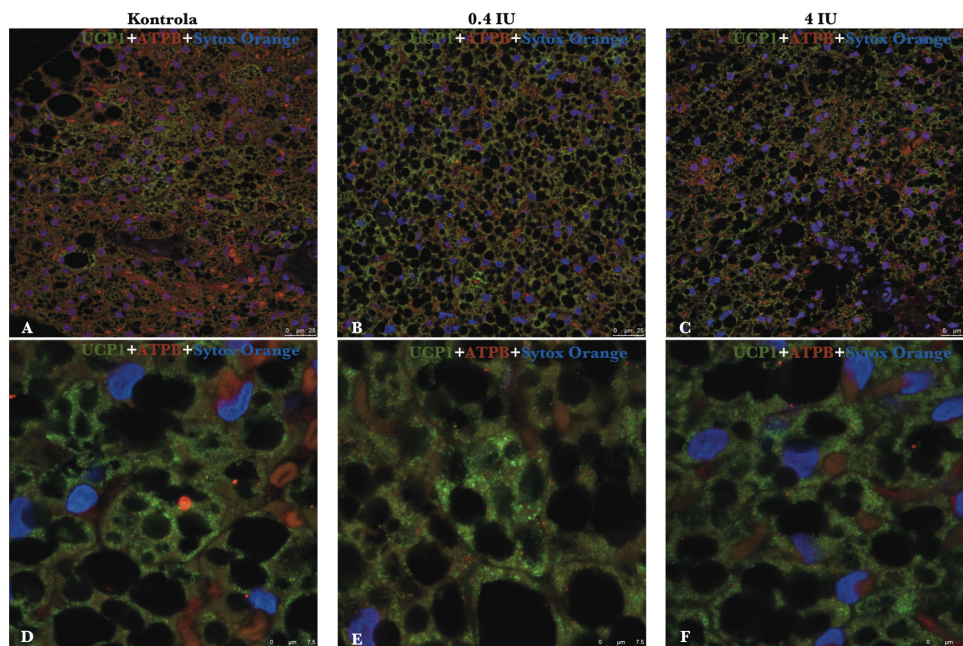
4.2.4.11 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA KATALAZE

Katalaza, marker peroksizoma, se na nivou fluorescentne mikroskopije detektuje u mrkim adipocitima samo kod hronično tretiranih grupa (Slika 67), i češće se uočava u blizini lipidnih tijela i nukleusa. U poređenju sa kontrolom, imunoekspresija je povećana u grupama tretiranim insulinom, ali ne značajno. Imunolokalizacija katalaze u mrkim adipocitima je značajno manja kada se poredi sa jetrom, koja je uzeta kao pozitivna kontrola.

4.2.4.12 IMUNOFLUORESCENTNA LOKALIZACIJA MFN1

Lokalizacija molekuskog posrednika mitohondrijalne fuzije, Mfn1, u BAT takođe je analiziran nakon akutnog (Slika 68) i hroničnog (Slika 69) tretmana niskom (0.4 IU) i visokom (4 IU) dozom insulina.

U kontroli akutnog tretmana, uočava se tipičan Harlekin efekat, odnosno heterogenost imunofluorescencije mrkih adipocita na Mfn1. Lokalizovane su u mitohondrijama, i uočavaju se oko nukleusa i oko lipidnih tijela. Heterogenost imunoekspresije mrkih adipocita se djelimično



Slika 56. Imunofluorescentna lokalizacija ATP sintaze i UCP₁ nakon akutnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP₁ (*zeleno*) i ATP sintazu (*crveno*). Jedra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 25 μ m (A-C), 7.5 μ m (D-F).

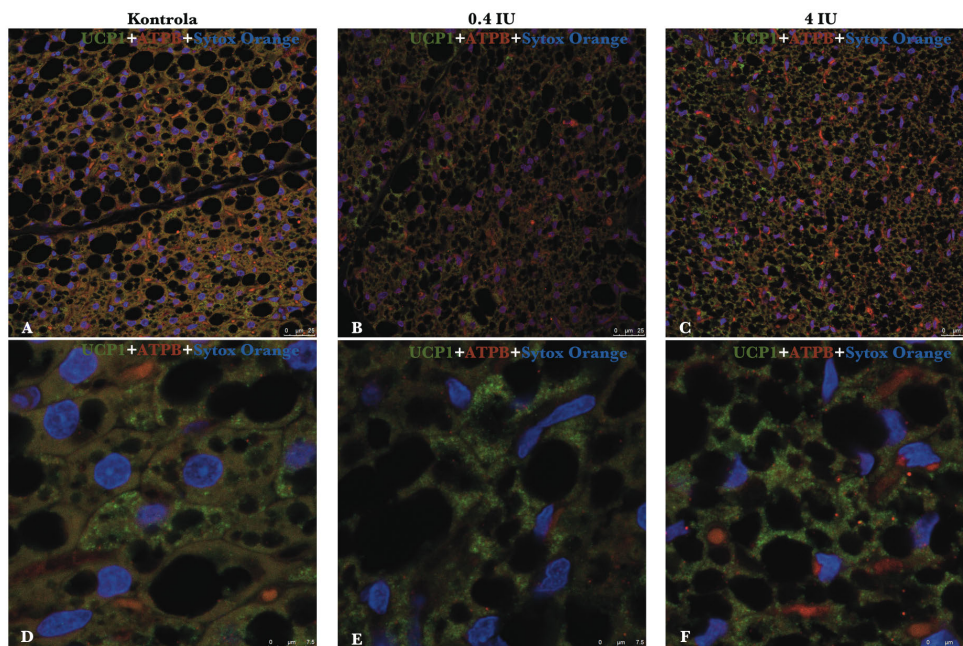
gubi nakon insulinskog tretmana.

Hronično tretirane grupe se takođe odlikuju heterogenom imunoekspresijom Mfn₁ u mrkim adipocitima. Kontrola pokazuje tipičnu heterogenost među mrkim adipocitima (Harlekin efekat), a nakon tretmana insulinom ta heterogenost se gubi zbog homogenizacije među mrkim adipocitima. Mfn₁-pozitivne mitohondrije se najviše uočavaju oko lipidnih tijela, kao i oko nukleusa.

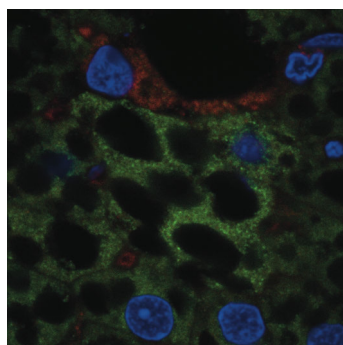
4.2.4.13 IMUNOHISTOHEMIJSKA LOKALIZACIJA MFN₁

Imunohistohemijska detekcija Mfn₁ u BAT akutno tretiranih grupa (Slika 70) pokazuje da se imunopozitivnost uočava oko lipidnih tijela, pa i u ostatku citoplazme. Kontrola (Slika 70A) pokazuje jaču imunopozitivnost, a grupa tretirana niskom (0.4 IU) dozom insulina (Slika 70B) manju imunopozitivnost u odnosu na kontrolu. Najmanju imunopozitivnost na Mfn₁ pokazuje grupa tretirana visokom dozom insulina (Slika 70C).

U slučaju hronično tretiranih grupa (Slika 71), u kontroli se uočava heterogenost gdje se pojedini mrki adipociti odlikuju imunopozitivnošću, i to uglavnom oko lipidnih tijela (Slika 71A). Jača imunopozitivnost se uočava u grupi tretiranoj niskom dozom insulina (Slika 71B), i



Slika 57. Imunofluorescentna lokalizacija ATP sintaze i UCP₁ nakon hroničnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP₁ (*zeleno*) i ATP sintaze (*crveno*). Jedra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 25 μ m (A-C), 7.5 μ m (D-F).

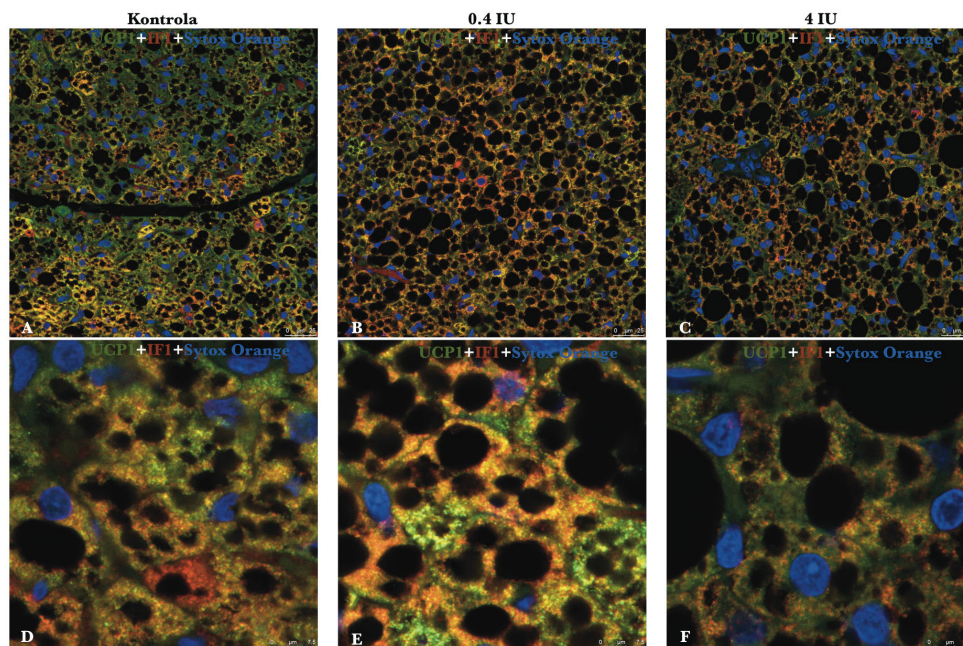


Slika 58. Heterogenost mrkih adipocita u imunoekspresiji ATP sintaze i UCP₁.

to oko lipidnih tijela. Niska doza smanjuje heterogenost imunopozitivnosti među mrkim adipocitima uslijed homogenizacije navedene imunoekspresije. Sa druge strane, visoka doza insulina blago povećava heterogenost među mrkim adipocitima, pri čemu se uglavnom uočava oko lipidnih tijela (Slika 71C).

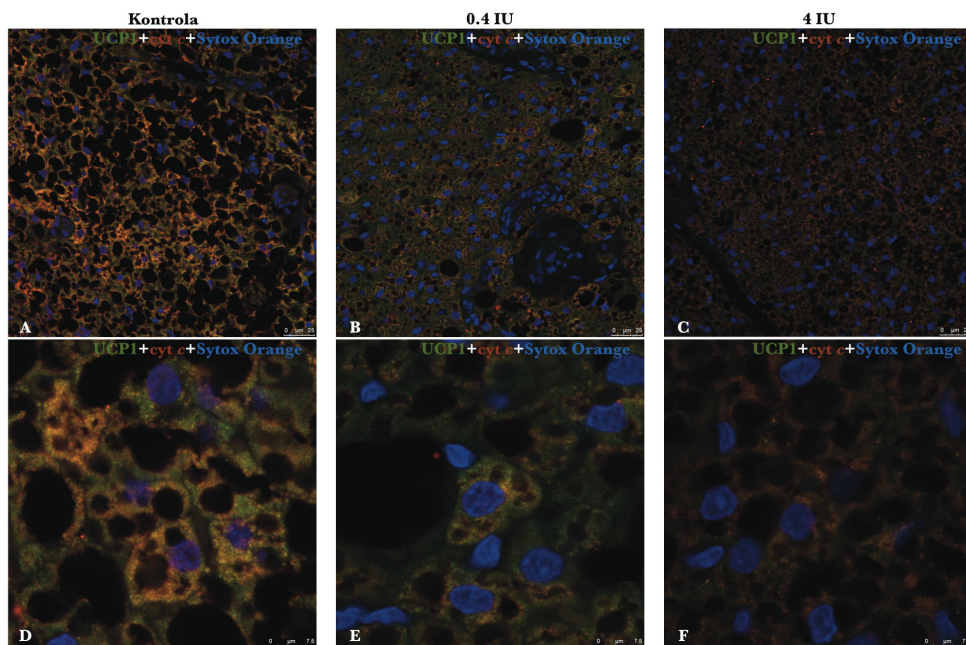
4.2.4.14 IMUNOHISTOHEMIJSKA LOKALIZACIJA DRP1

Imunohistohemijski je takođe analiziran Drp1, neophodan za mitohondrijalnu fisiju, u BAT pacova tretiranih niskom (0.4 IU), odnosno visokom (4 IU) dozom insulina akutno (Slika 72) ili hronično (Slika 73). U obe kontrole uočava se heterogenost mrkih adipocita u smislu imunopozitivnosti na Drp1. Drp1-pozitivne mitohondrije su lokalizovane u citoplazmi i u vidu

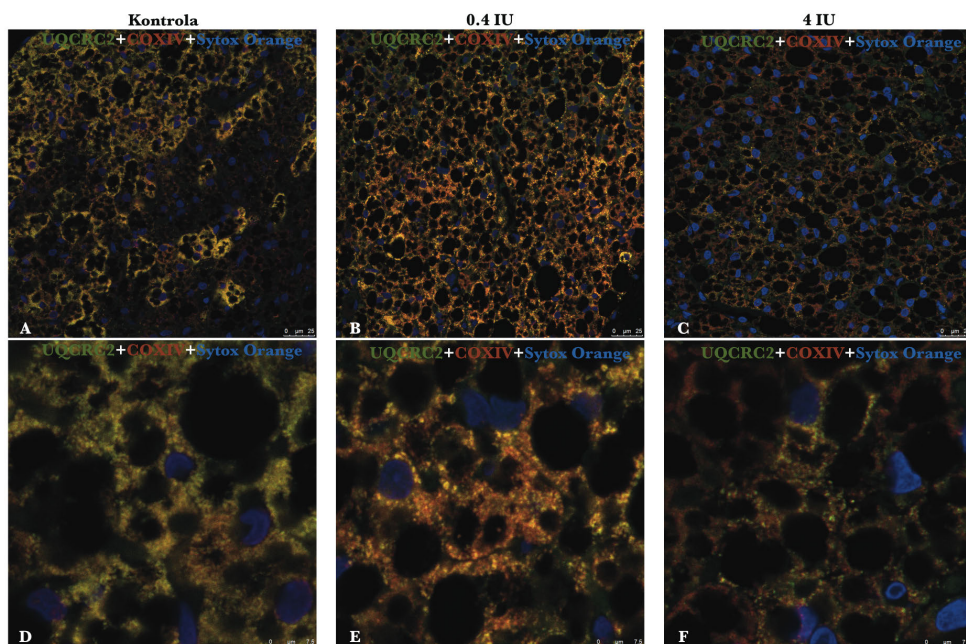


Slika 59. Imunofluorescentna lokalizacija IF₁ i UCP₁ nakon akutnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP₁ (zeleno) i IF₁ (crveno). Jedra su obojena Sytox Orange (plavo). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).

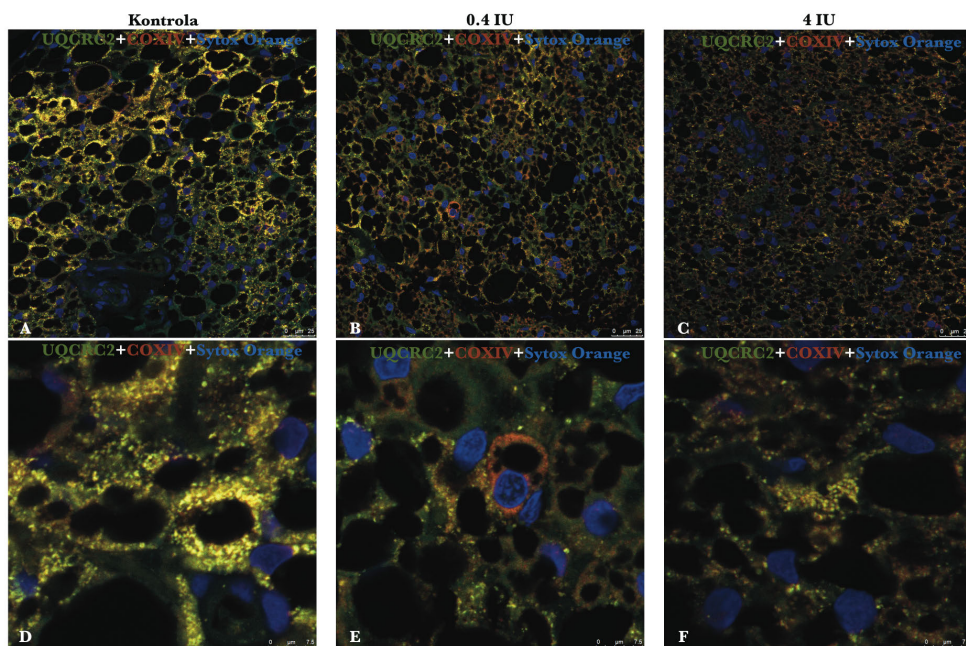
klastera oko lipidnih tijela. Obe doze insulina, bez obzira na dužinu tretmana, smanjuju imunopozitivnost na Drp₁ u odnosu na odgovarajuće kontrole.



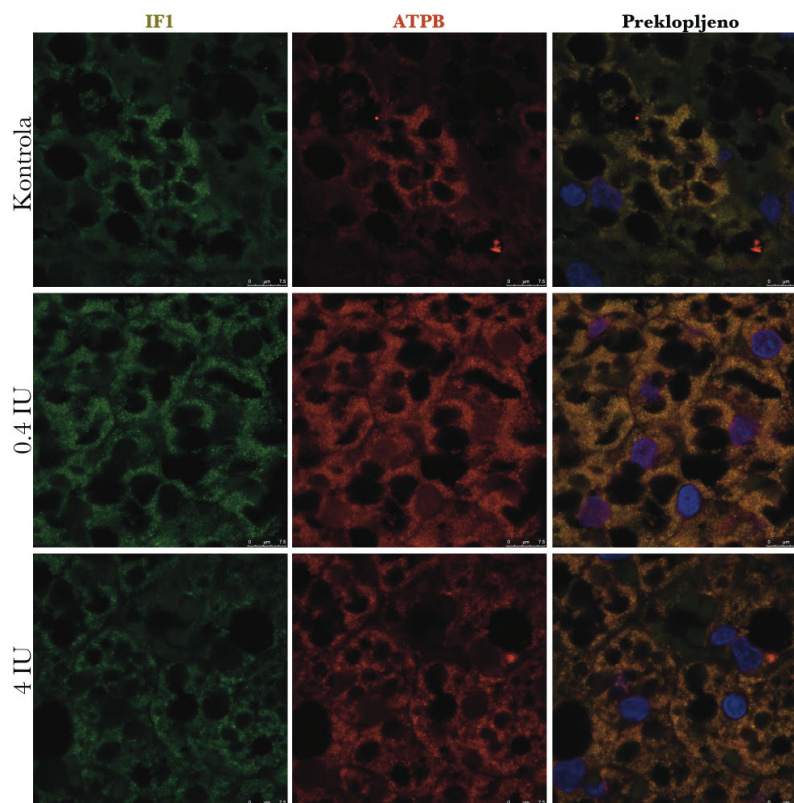
Slika 60. Imunofluorescentna lokalizacija IF1 i UCP1 nakon hroničnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na UCP1 (zeleno) i IF1 (crveno). Jedra su obojena Sytox Orange (plavo). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).



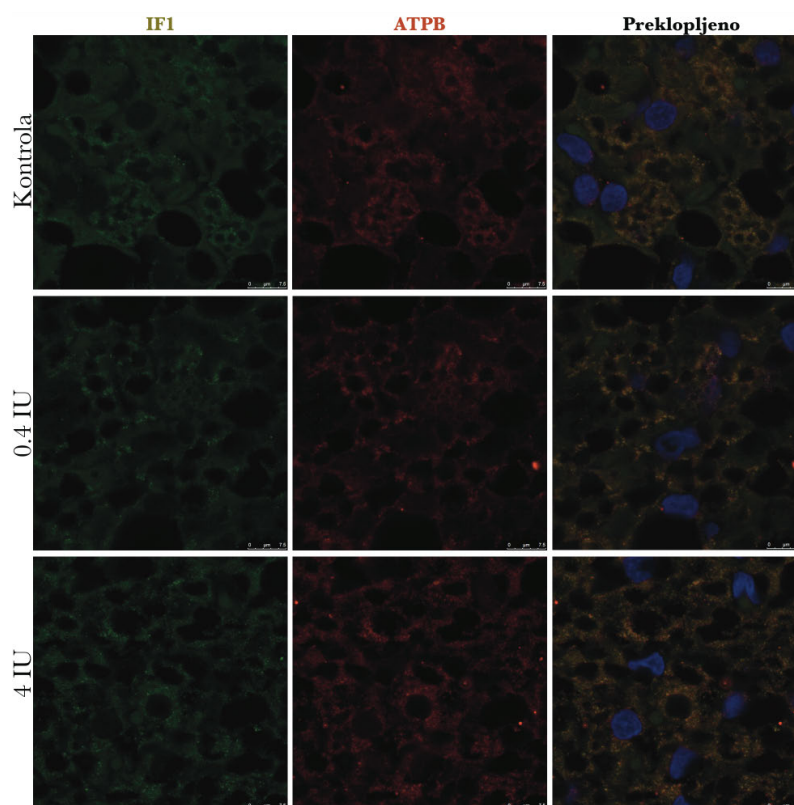
Slika 61. Imunofluorescentna lokalizacija CIII i CIV nakon akutnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na kompleks III (zeleno) i kompleks IV (crveno). Jedra su obojena Sytox Orange (plavo). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).



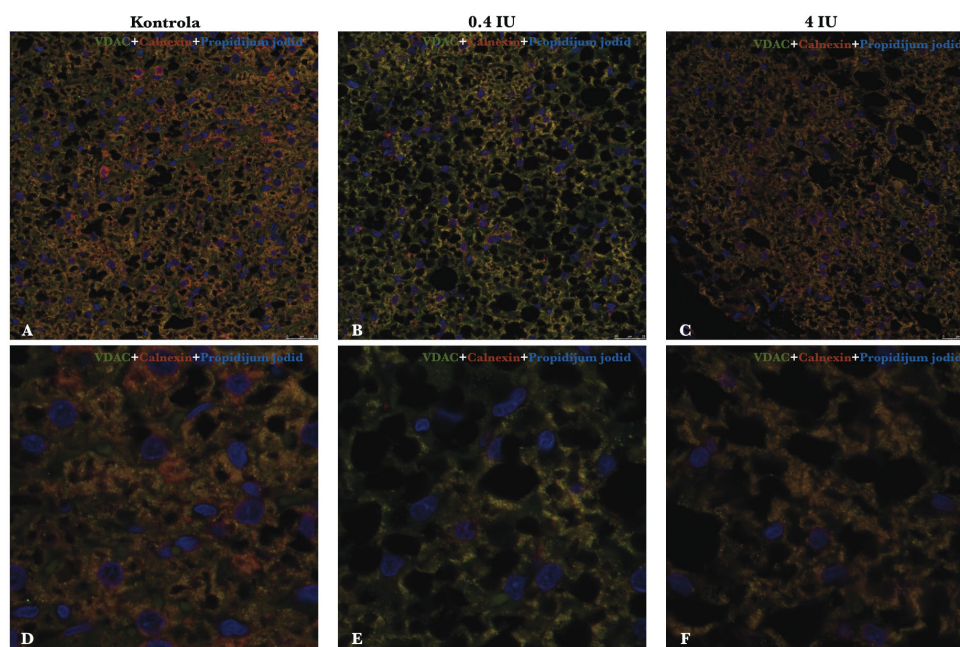
Slika 62. Imunofluorescentna lokalizacija CIII i CIV nakon hroničnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na kompleks III (*zeleno*) i kompleks IV (*crveno*). Jedra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).



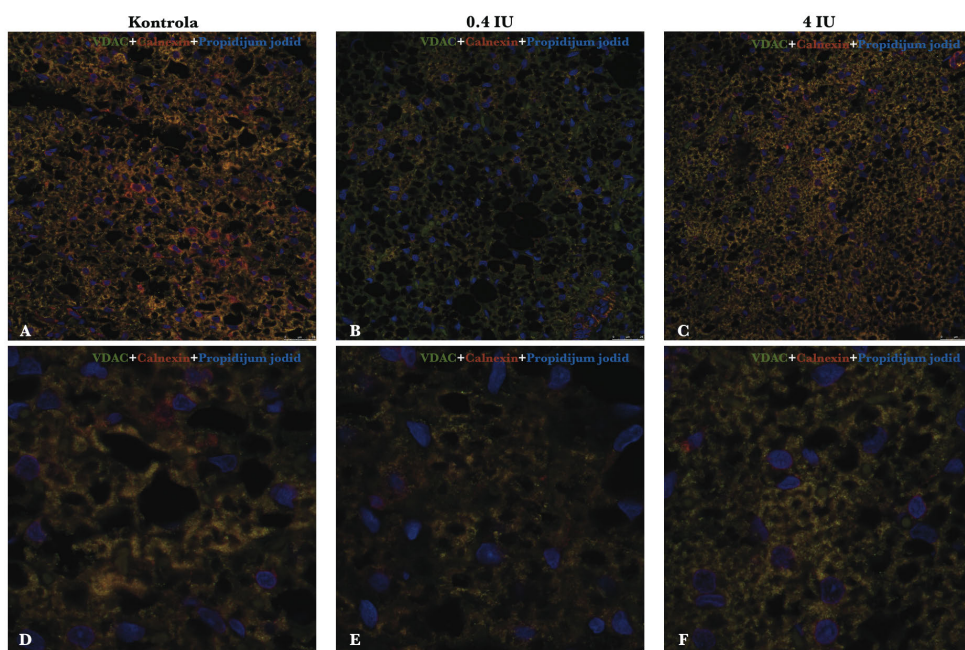
Slika 63. Imunofluorescentna lokalizacija ATP sintaze i IF1 nakon akutnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na IF1 (*zeleno*) i ATP sintazu (*crveno*). Jedra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 7.5 μm .



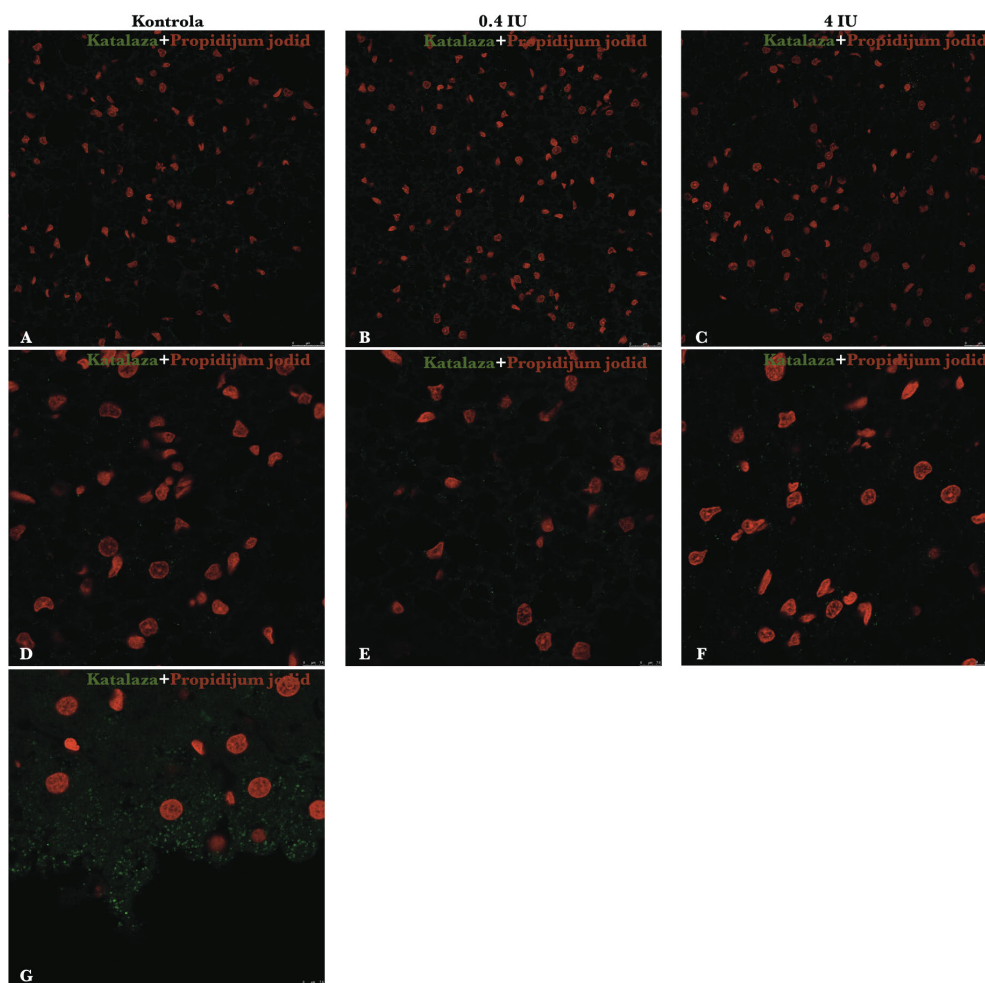
Slika 64. Imunofluorescentna lokalizacija ATP sintaze i IF1 nakon hroničnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na IF1 (*zeleno*) i ATP sintazu (*crveno*). Jedra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 7.5 μm .



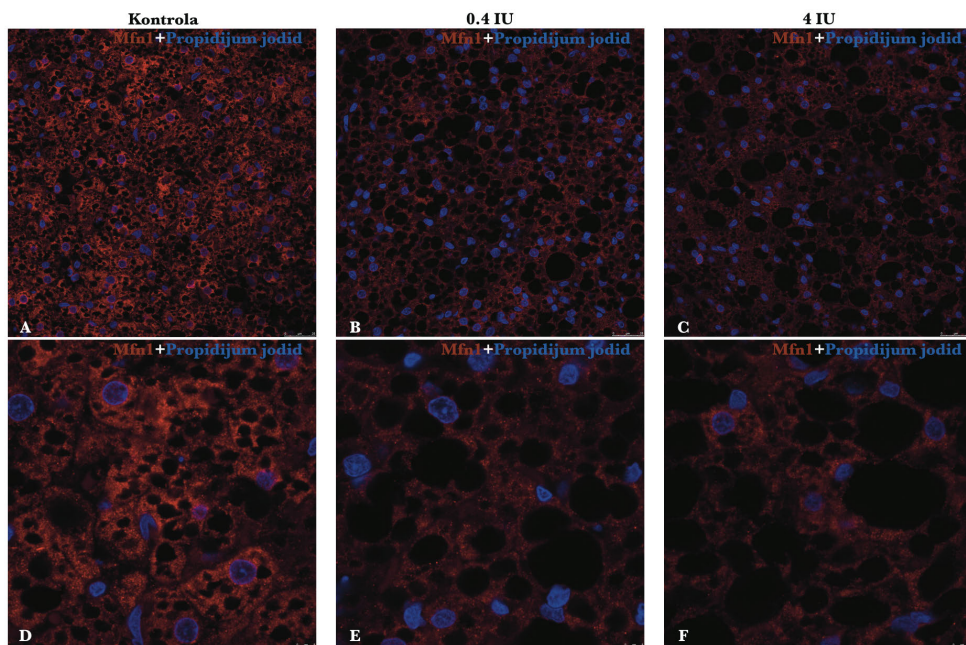
Slika 65. Imunofluorescentna lokalizacija VDAC i kalneksina nakon akutnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na VDAC (*zeleno*) i kalneksin (*crveno*). Jedra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).



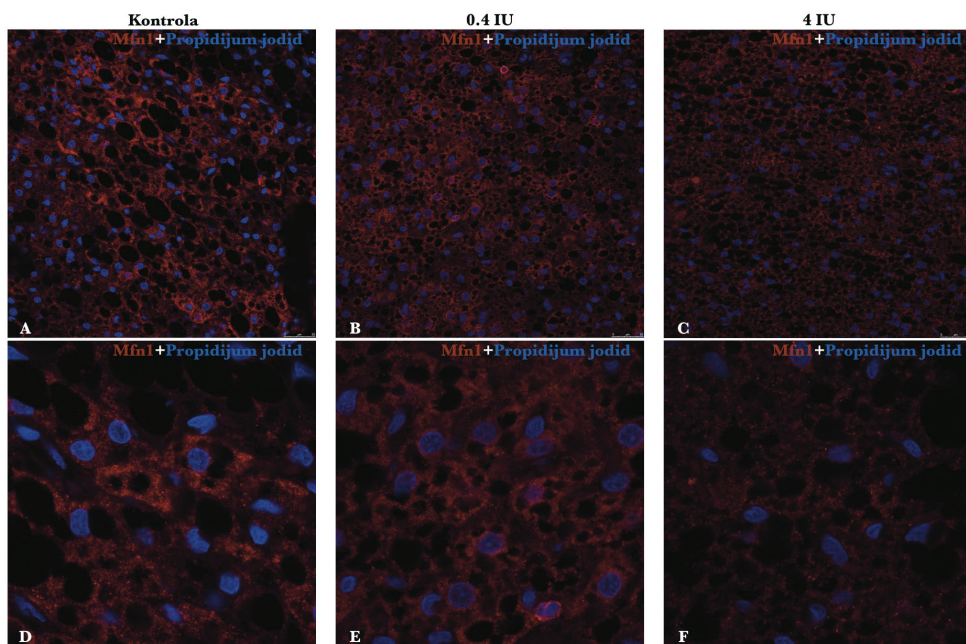
Slika 66. Imunofluorescentna lokalizacija VDAC i kalneksina nakon hroničnog tretmana insulinom. Dvostruka imunofluorescencija sa antitijelima na VDAC (*zeleno*) i kalneksin (*crveno*). Jedra su obojena Sytox Orange (*plavo*). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).



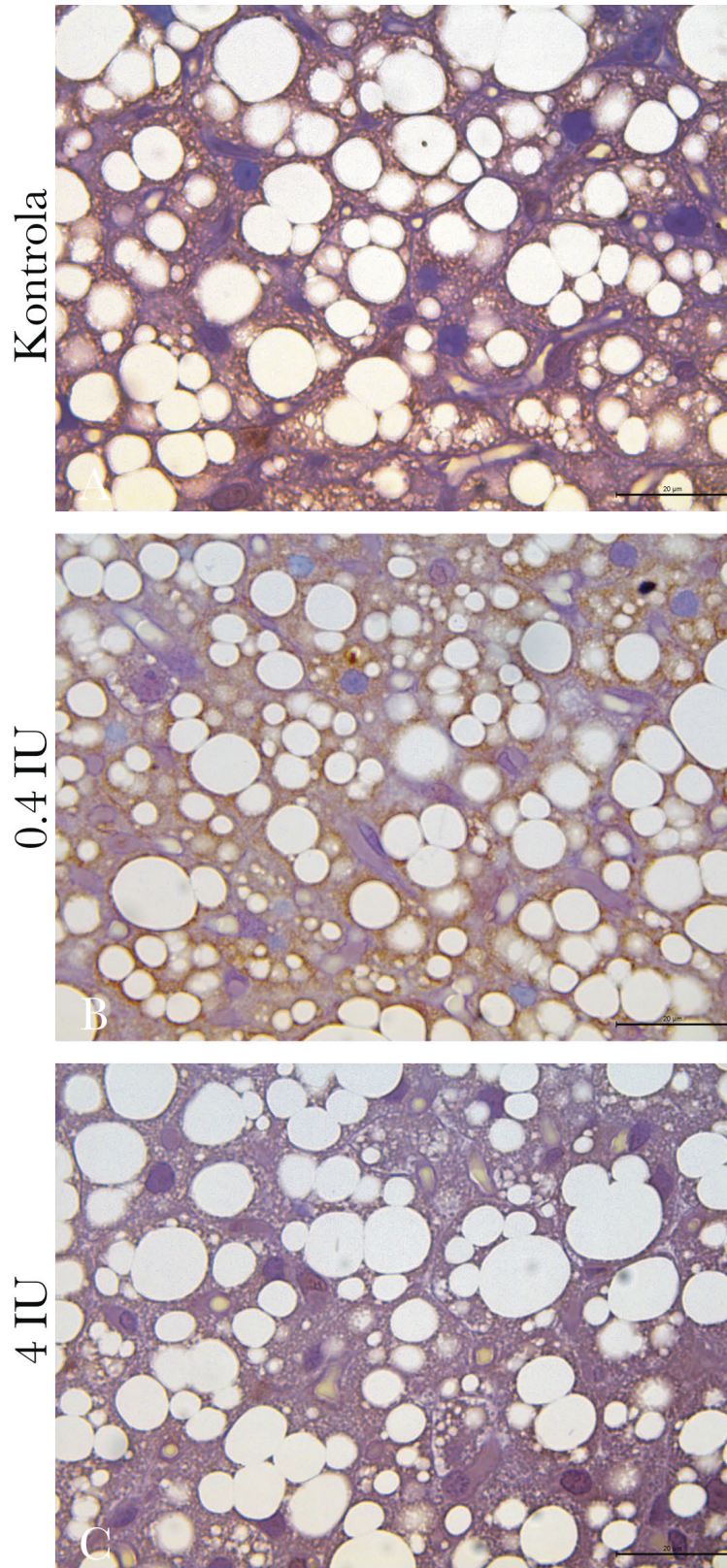
Slika 67. Imunofluorescentna lokalizacija katalaze nakon hroničnog tretmana insulinom. Imunofluorescencija sa antitijelom na katalazu (*zeleno*). Jedra su obojena propidijum jodidom (*crveno*). (A-F) BAT; (G) pozitivna kontrola katalaze (jetra). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-G).



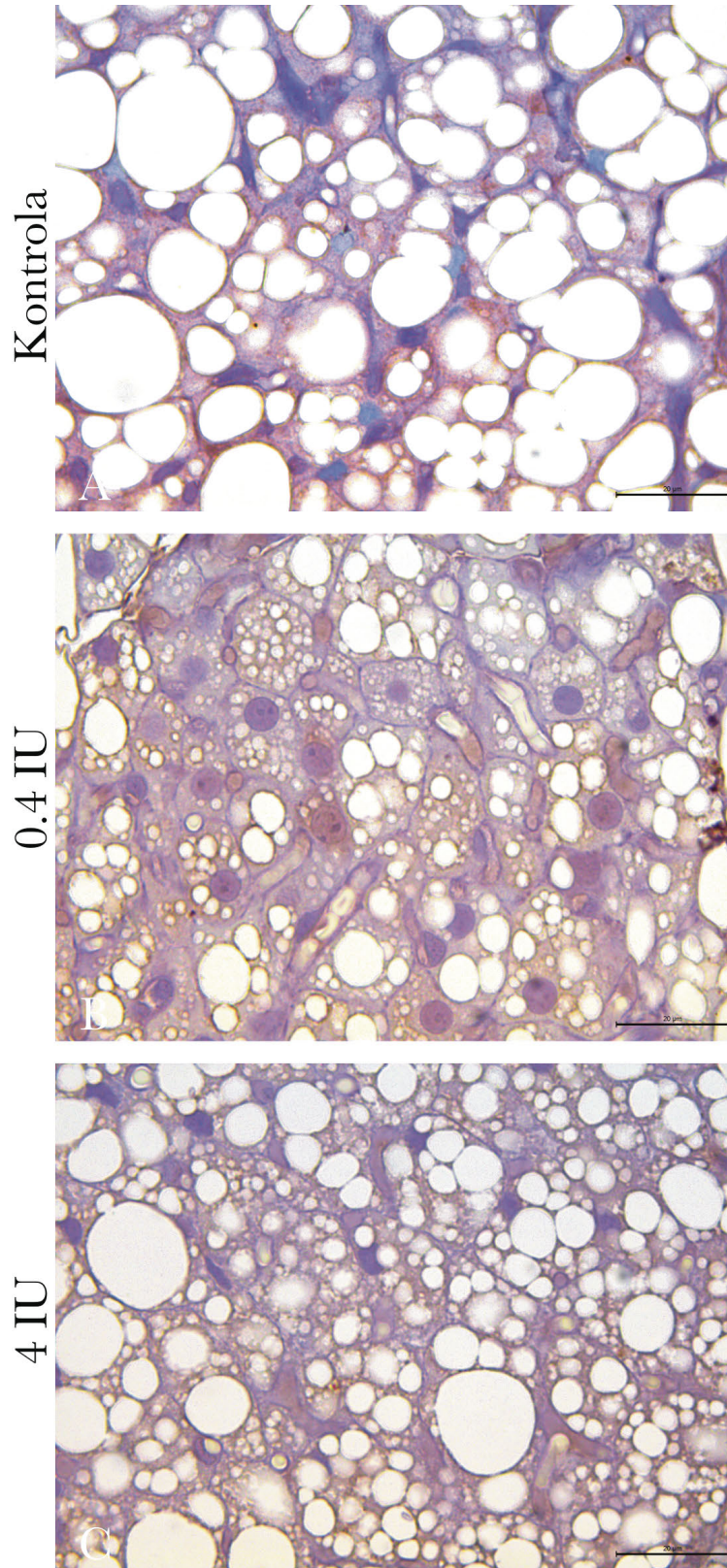
Slika 68. Imunofluorescentna lokalizacija Mfn1 nakon akutnog tretmana insulinom. Imunofluorescencija sa antitijelom na Mfn1 (*crveno*). Jedra su obojena propidijum jodidom (*crveno*). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).



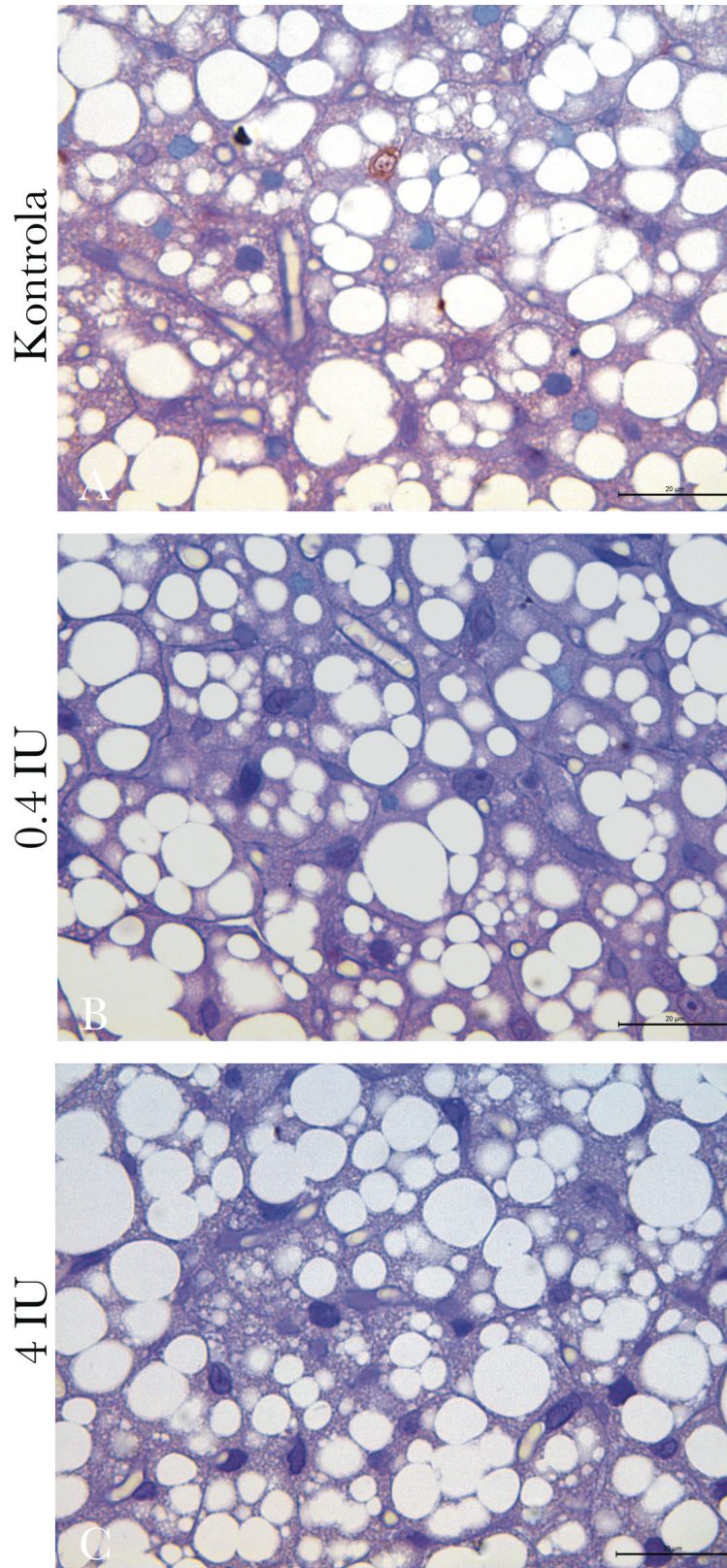
Slika 69. Imunofluorescentna lokalizacija Mfn1 nakon hroničnog tretmana insulinom. Imunofluorescencija sa antitijelom na Mfn1 (*crveno*). Jedra su obojena propidijum jodidom (*crveno*). Bar: 25 μm (A-C), 7.5 μm (D-F).



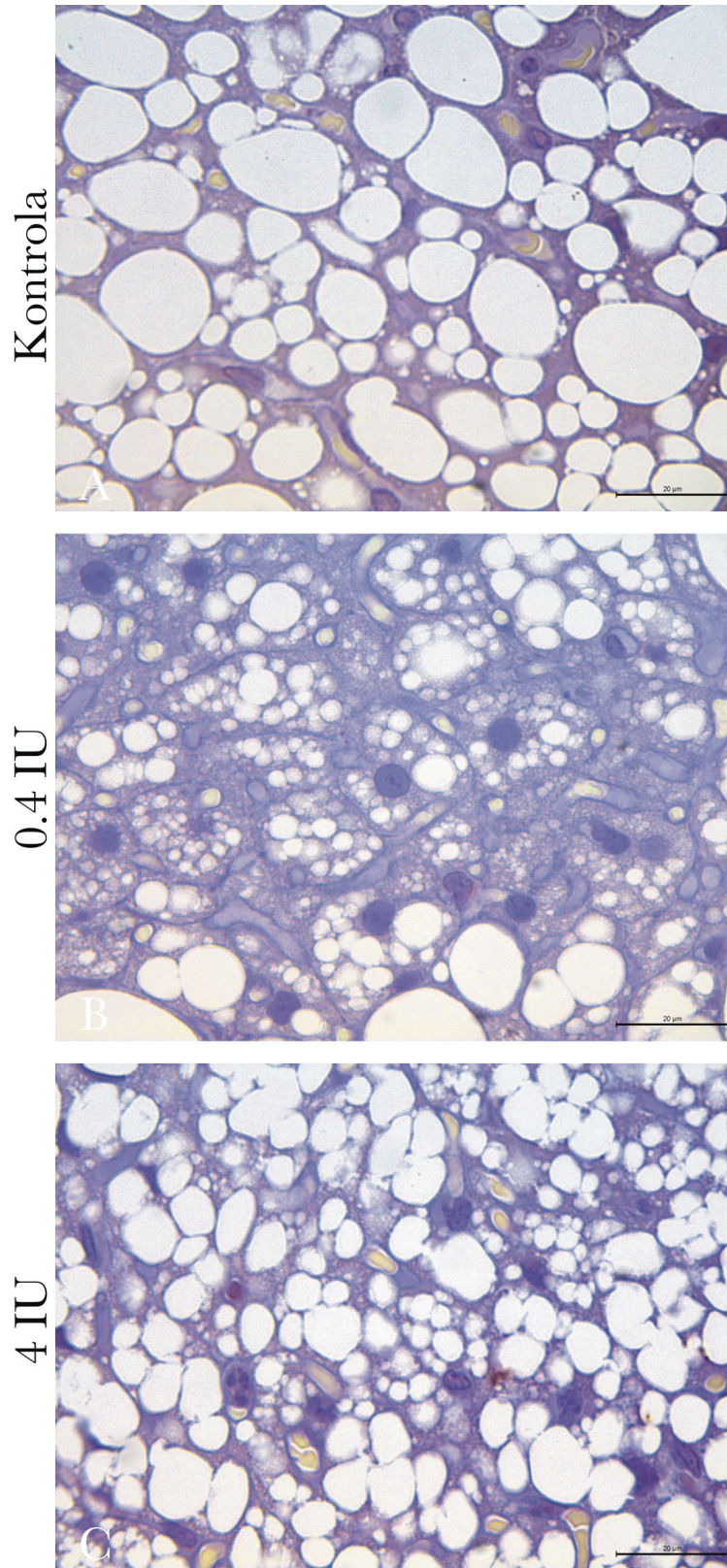
Slika 70. Imunohistohemijska lokalizacija Mfn1 nakon akutnog tretmana insulinom. Bar: 20 µm.



Slika 71. Imunohistohemijska lokalizacija Mfn1 nakon hroničnog tretmana insulinom. Bar: 20 µm.



Slika 72. Imunohistohemijska lokalizacija Drp1 nakon akutnog tretmana insulinom. Bar: 20 µm.

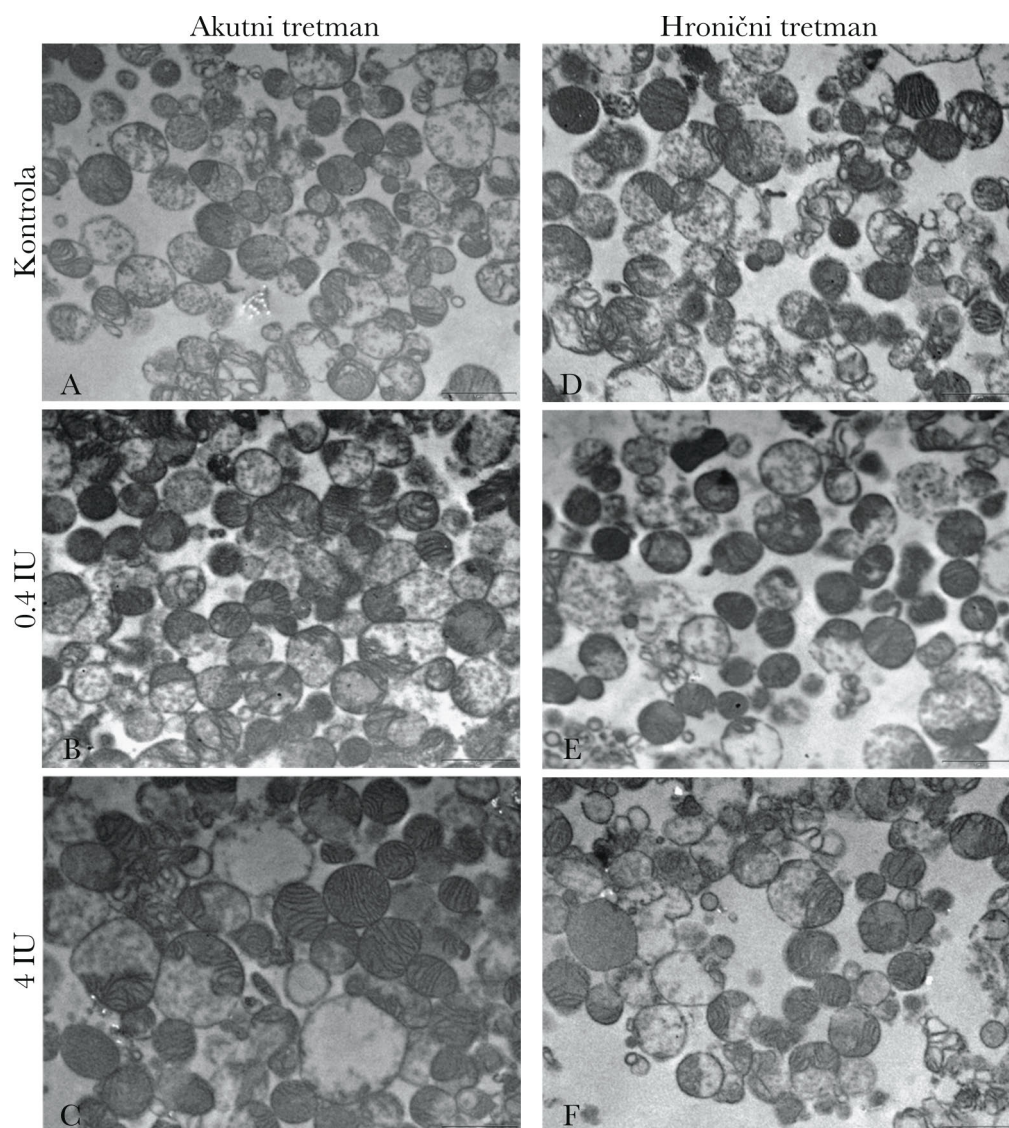


Slika 73. Imunohistohemijska lokalizacija Drp1 nakon hroničnog tretmana insulinom. Bar: 20 µm.

4.3 ULTRASTRUKTURNE ANALIZE

4.3.0.1 TEM MITOHONDRIJAMA BOGATE FRAKCIJE

TEM pokazuje uspješnost izolacije mitohondrijama bogatih frakcija (Slika 74). Morfološki, mitohondrije su okruglaste, sa jasno razvijenim lamelarnim kristama. U svim grupama se uočavaju ortodoksne, ali i kondenzovane mitohondrije.



Slika 74. Transmisiona elektronska mikroskopija mitohondrijama bogatih frakcija BAT nakon akutnog i hroničnog tretmana insulinom. Bar: 1 μ m.

4.3.0.2 CITOHEMIJSKA ANALIZA KOMPLEKSA I *IN SITU*

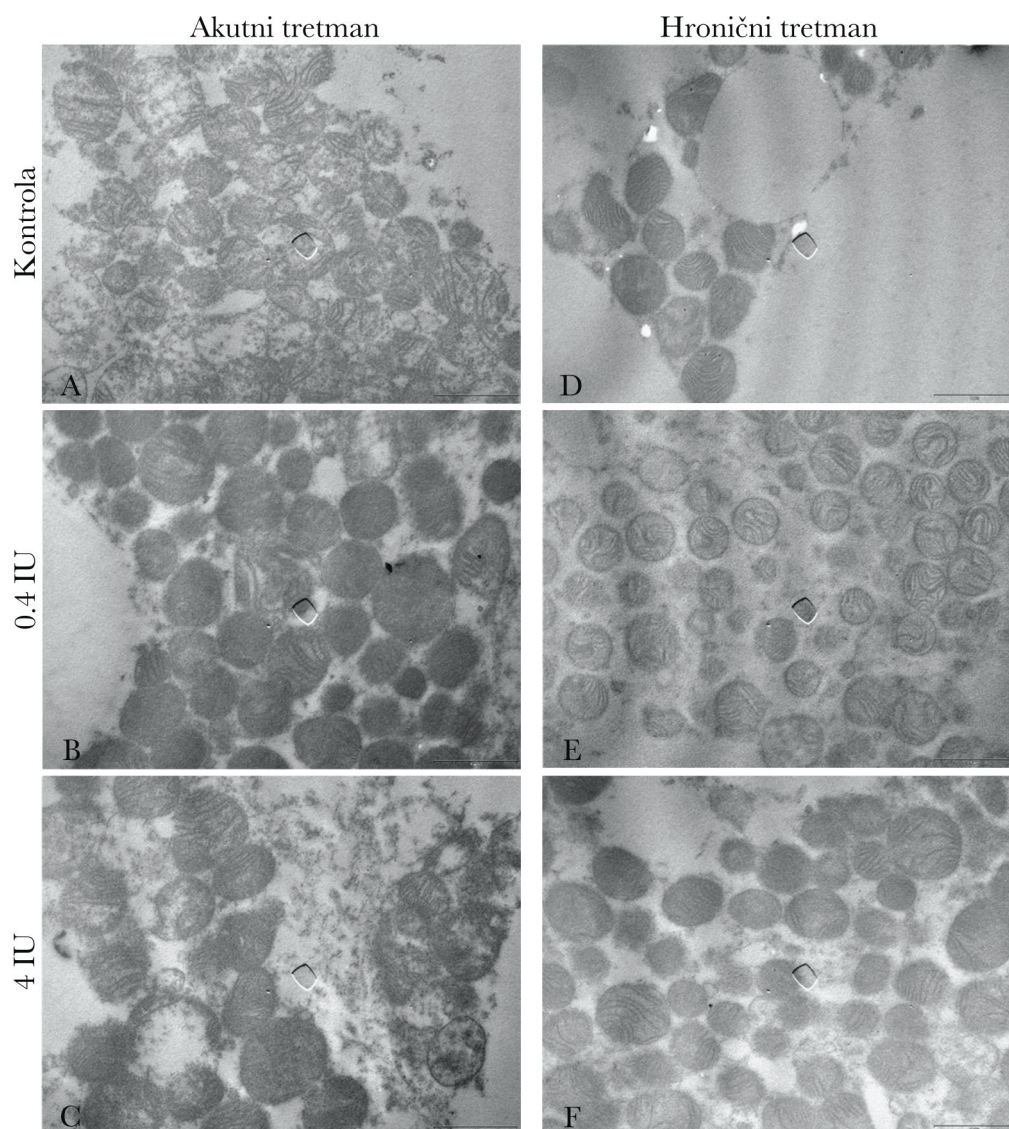
U BAT životinja akutno i hronično tretiranih insulinom (Slika 75) se uočava pozitivna reakcija u mitohondrijalnim kristama, gdje se nalazi kompleks I elektron transportnog lanca. Jača reakcija se uočava u mitohondrijama životinja tretiranih akutno niskom (0.4 IU) (Slika 75B) odnosno visokom (4 IU) (Slika 75C) dozom insulina, u odnosu na kontrolu (Slika 75A). Sa druge strane, hronični tretman insulinom dovodi do nešto manje reaktivnosti u grupi sa niskom dozom insulina (Slika 75E) u odnosu na kontrolu (Slika 75D) kao i grupu tretiranu visokom dozom insulina (Slika 75F). Citohemijska reakcija je potvrđena negativnom kontrolom u odsustvu supstrata (Slika 76A), odnosno u prisustvu supstrata uz dodatak rotenona, specifičnog inhibitora kompleksa I (Slika 76B).

4.3.0.3 CITOHEMIJSKA ANALIZA KOMPLEKSA II *IN SITU*

Citohemijska analiza kompleksa II mitohondrija BAT pacova tretiranih akutno, odnosno hronično niskom (0.4 IU) i visokom (4 IU) dozom insulina pokazuje lokalizaciju reakcije u kristama (Slika 77). Akutna, visoka doza insulina dovodi do jače obojenosti reakcije (Slika 77C) u odnosu na kontrolu (Slika 77A), odnosno nisku dozu insulina (Slika 77B). Hronični tretman insulinom pokazuje da grupe tretirane niskom dozom (Slika 77E) imaju jaču reakciju u odnosu na grupu sa visokom dozom insulina (Slika 77F), ali su obe grupe nešto slabije obojene u odnosu na kontrolu (Slika 77D). Ova citohemijska analiza je potvrđena odsustvom supstrata u medijumu (Slika 76A), odnosno sa supstratom u prisustvu oksaloacetata, specifičnog inhibitora kompleksa II (Slika 76C).

4.3.0.4 CITOHEMIJSKA LOKALIZACIJA VODONIK PEROKSIDA

Elektron mikroskopska analiza DAB inkubiranih uzoraka BAT pacova tretiranih akutnom, odnosno hroničnom niskom (0.4 IU) i visokom (4 IU) dozom insulina pokazuje citohemijsku lokalizaciju vodonik peroksida u mitohondrijama, pogotovo u kristama (Slika 78). Akutni tretman insulinom dovodi do povećanja citohemijske reakcije u odnosu na kontrolnu grupu, gdje je efekat izraženiji nakon primjene visoke doze. Hronični tretmani insulinom takođe dovode do povećanja citohemijske reakcije u odnosu na kontrolu, pri čemu je izraženija reakcija nakon hronične visoke doze insulina.



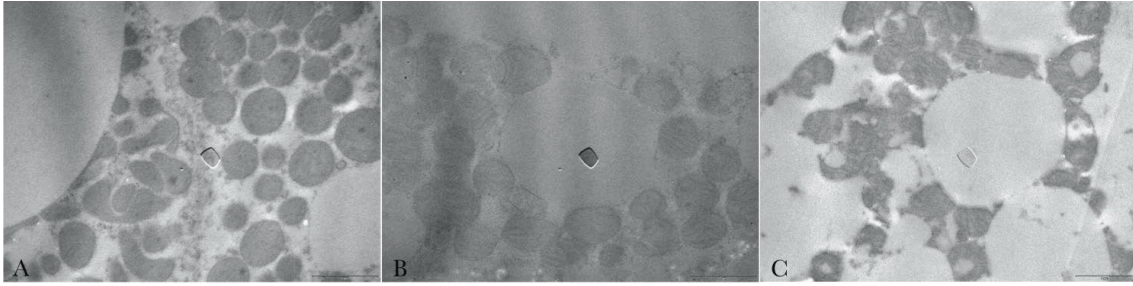
Slika 75. Citohemijska analiza kompleksa I u mitohondrijama BAT nakon akutnog i hroničnog tretmana insulinom. Bar: 1 μm .

4.3.0.5 TOMOGRAFSKA REKONSTRUKCIJA MITOHONDRIJA

Na osnovu dobijenih mikrografija snimljenih svaki stepen od -45° do $+45^\circ$ (Slika 79), urađena je rekonstrukcija mitohondrija.

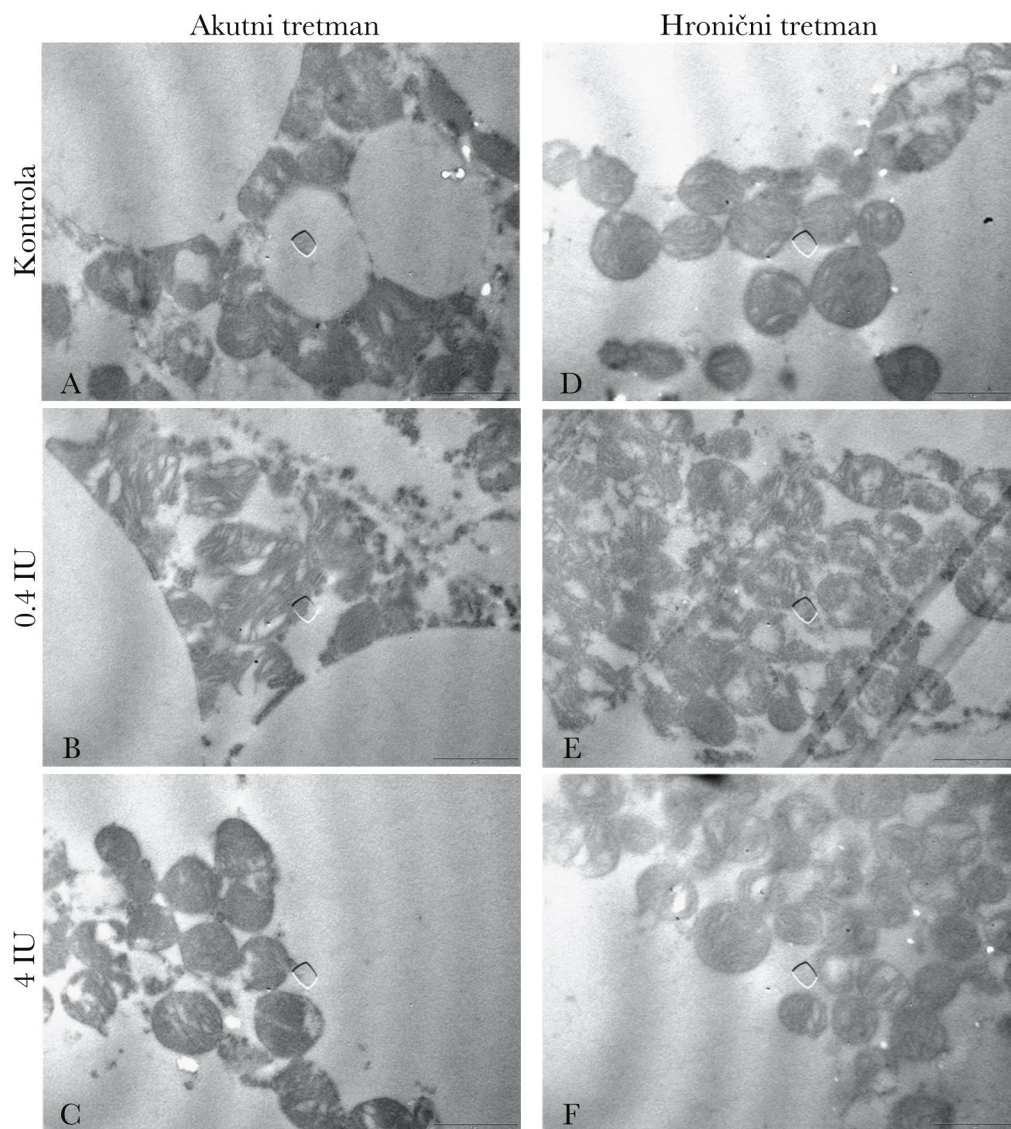
4.3.0.6 IMUNOGOLD LOKALIZACIJA KOMPLEKSA III I KOMPLEKSA IV

Imunogold analiza mitohondrijama bogatih frakcija BAT pacova akutno, odnosno hronično tretiranih niskom (0.4 IU) ili visokom (4 IU) dozom insulina pokazuje lokalizaciju kompleksa III (čestica zlata dijametra 10 nm) i kompleksa IV (čestica zlata dijametra 20 nm) u

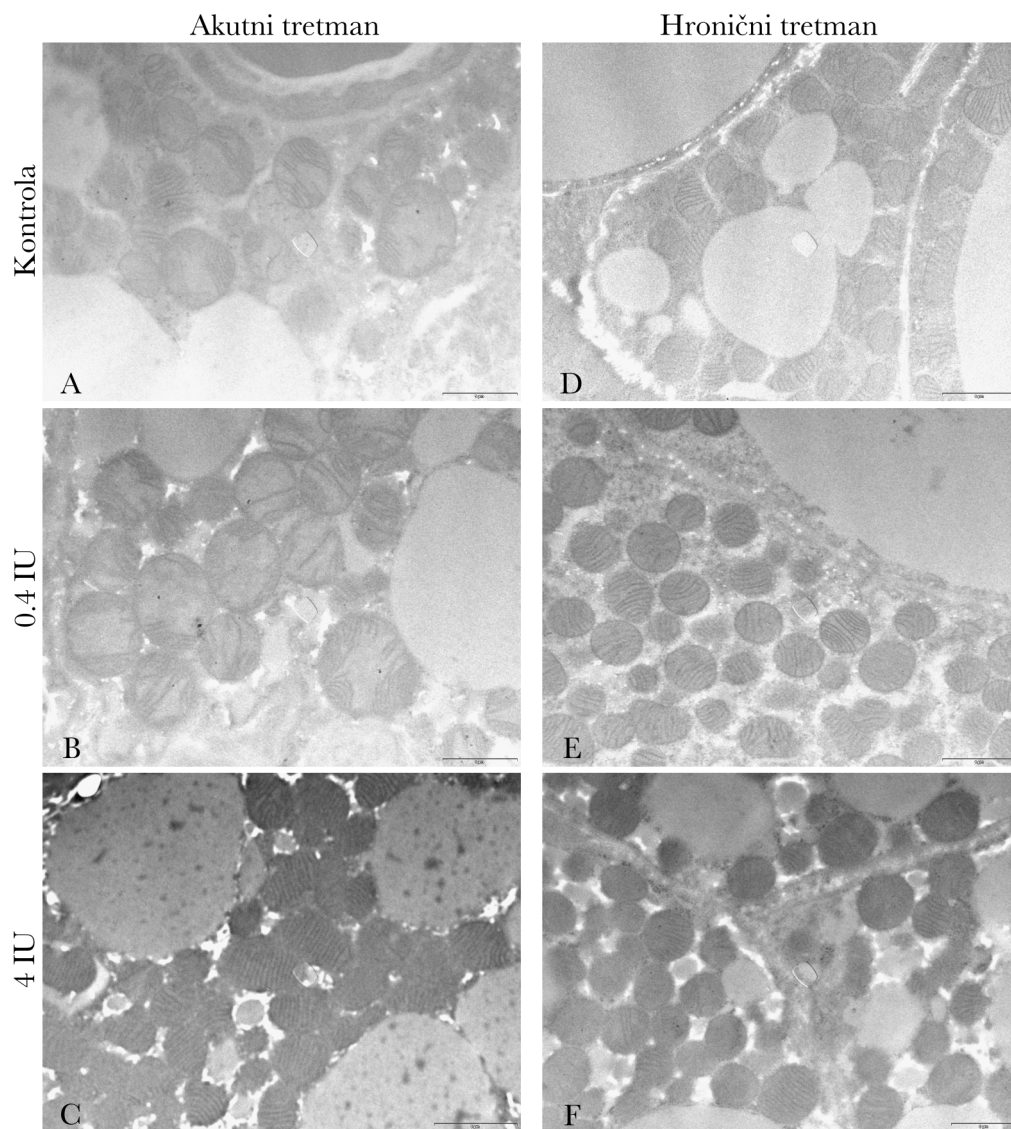


Slika 76. Kontrola citohemijske analize mitohondrija BAT. (A) Negativna kontrola, bez supstrata; (B) rotenon, inhibitor kompleksa I; (C) oksaloacetat, inhibitor kompleksa II. Bar: 1 μm .

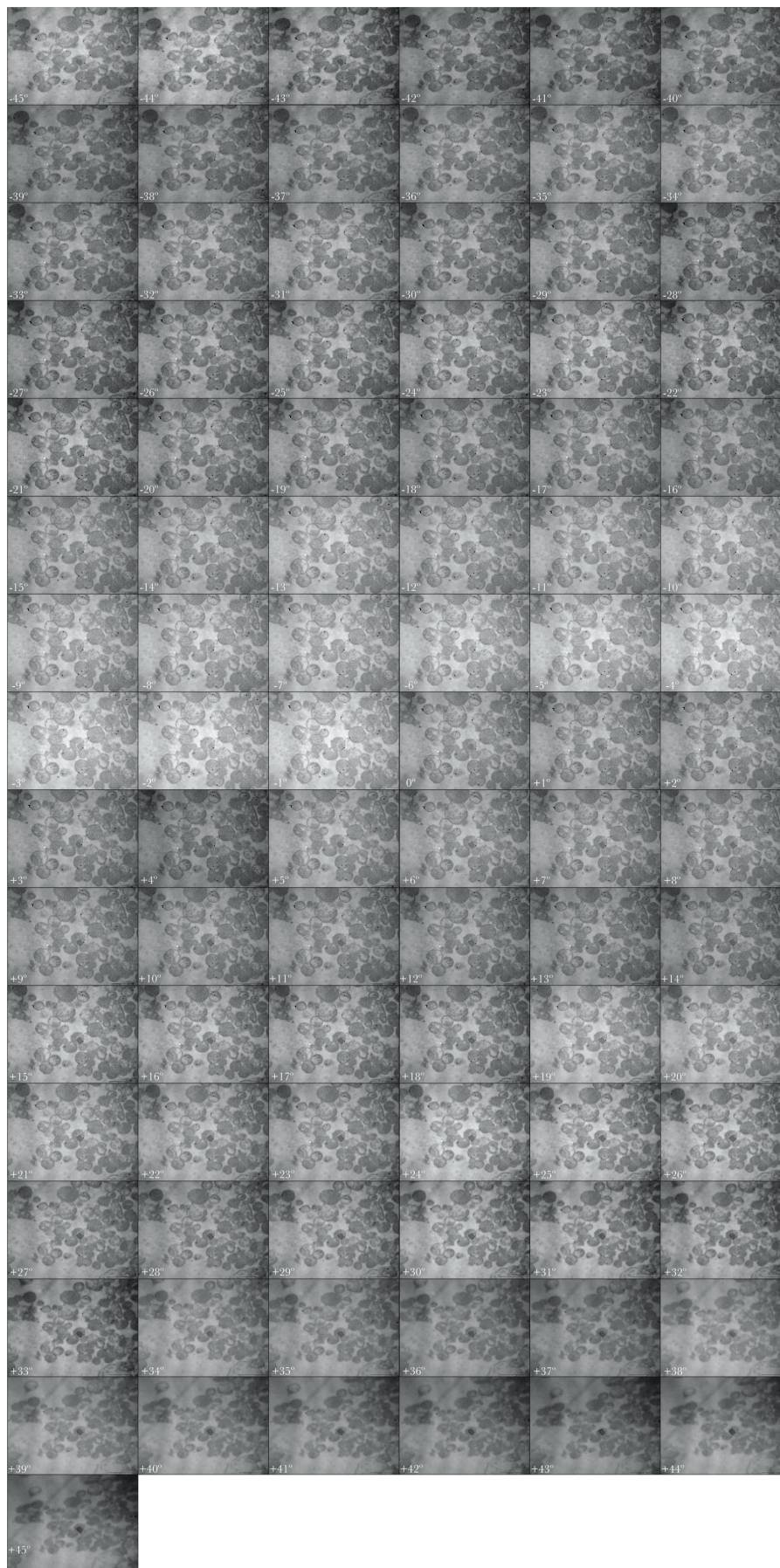
mitohondrijama u nivou kristi, a takođe se zapaža i njihova kolokalizacija (Slika 80).



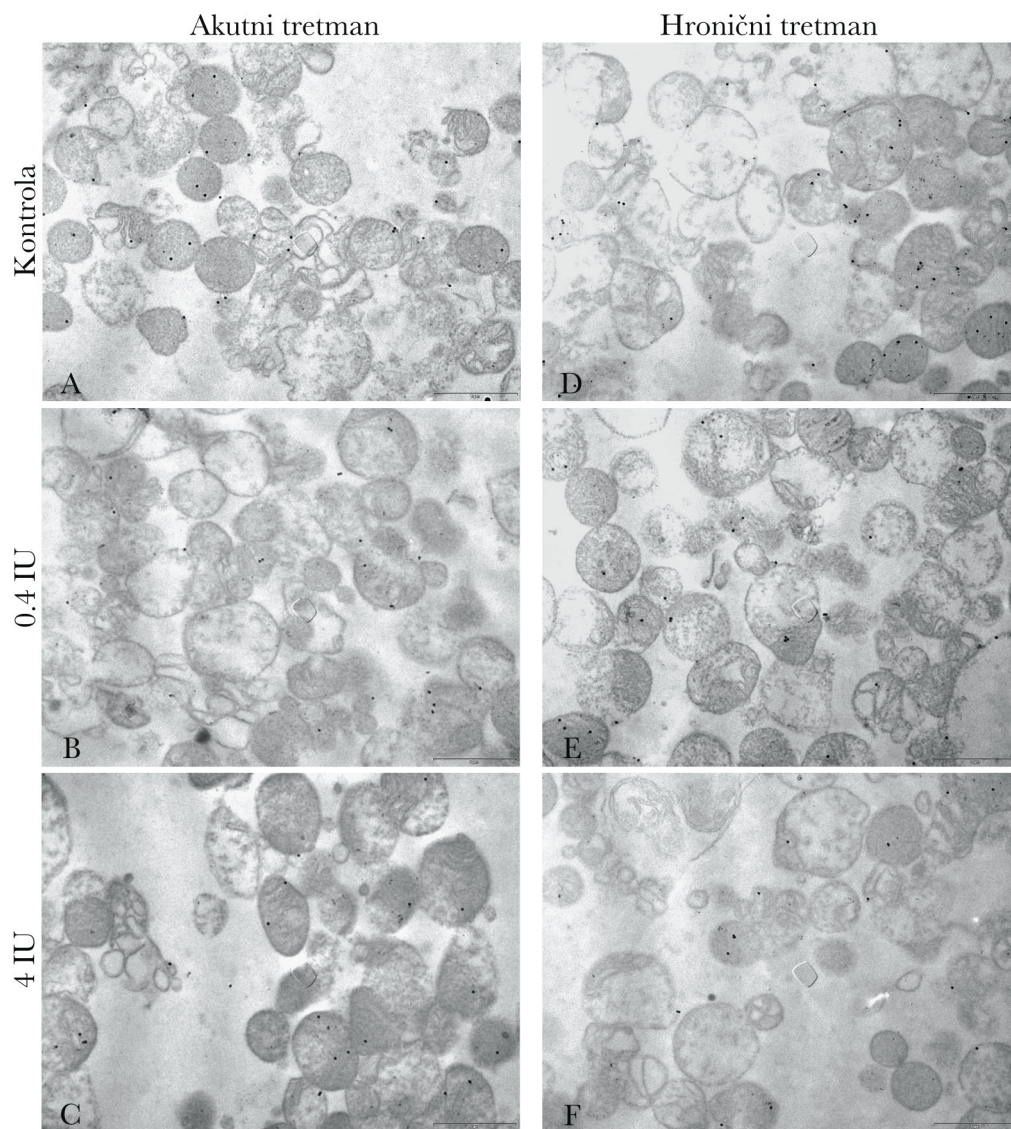
Slika 77. Citohemijska analiza kompleksa II u mitohondrijama BAT nakon akutnog i hroničnog tretmana insulinom. Bar: 1 μm .



Slika 78. Citohemijska lokalizacija vodonik peroksida u mitohondrijama BAT nakon akutnog i hroničnog tretmana insulinom. Bar: 1 μm .



Slika 79. Serija elektron mikrografija snimljenih svaki stepen od -45° do $+45^\circ$. Bar: $1 \mu\text{m}$.



Slika 80. Imunogold lokalizacija kompleksa III i IV u mitohondrijama bogatim frakcijama nakon akutnog i hroničnog tretmana insulinom. Bar: 1 μ m.

5 | Diskusija

5.1 CA-SANDOZ TRETMAN

5.1.1 POVEĆANJE NIVOVA KALCIJUMA U MRKIM ADIPOCITIMA

Naši rezultati lokalizacije Ca^{2+} ukazuju da Ca-SANDOZ tretman dovodi do povećanja nivoa Ca^{2+} u pojedinim mrkim adipocitima, što je u saglasnosti sa opisanim Harlekin efektom (Cinti i sar., 2002), upravo zbog različitih funkcionalnih kapaciteta mrkih adipocita. Pokazano je da je u mnogim ćelijskim tipovima unos Ca^{2+} iz vanćelijske sredine neophodan za održanje povećanog nivoa Ca^{2+} uslijed hormonskog odgovora (Pozzan i sar., 1986). Potrošnja Ca^{2+} iz unutarćelijskih rezervi, kao što su ER i mitohodrije, uzrokuje unos Ca^{2+} preko Ca^{2+} kanala u ćelijskoj membrani (Putney Jr., 2003), što je u saglasnosti sa našim rezultatima koji jasno pokazuju da čak i kratak Ca-SANDOZ tretman indukuje unos Ca^{2+} od strane mrkih adipocita i njihovo nagomilavanje u citoplazmi i mitohondrijama. Interesantno je da smo po prvi put pokazali alternativni mehanizam unošenja Ca^{2+} u mrke adipocite i mitohondrije mrkih adipocita putem egzozoma eritrocita. Naime, nakon tretmana Ca-SANDOZ uočava se masovna egzovezikulacija eritrocita u brojnim kapilarima BAT. U sledećim koracima uočeni su elektron-gusti kompleksi koji ulaze u citoplazmu mrkih adipocita i stacioniraju se u neposrednoj blizini, ali i u unutrašnjosti mitohondrija. Ne može se isključiti pojačan unos Ca^{2+} i ovim putem, putem egzozoma i hemihromnih kompleksa poreklom iz eritrocita. *In vitro*, nakon aplikacije noradrenalina, dolazi do povećanog nivoa Ca^{2+} u citoplazmi mrkih adipocita, koji je uzrokovan unosom unutarćelijskog, ali i vanćelijskog Ca^{2+} , i to preko α -adrenergičkog i/ili β -adrenergičkog signalnog puta (Wilcke i Nedergaard, 1989; Lee i sar., 1993). Dekuplovanje mitohondrija od strane UCP_1 , indukovano putem β_3 -adrenergičkog signalnog puta, uzrokuje oslobađanje Ca^{2+} iz mitohondrija, a zatim i iz ER putem inozitol $1,4,5$ -trifosfatnih InsP_3 receptora, što dalje aktivira i ulazak Ca^{2+} preko ćelijske membrane u citoplazmu mrkih adipocita pacova (Hayato i sar., 2011). Prema tome, možemo da pretpostavimo da Ca-SANDOZ tretman "oponaša"

hladnoću i utiče na strukturno remodeliranje mitohondrija, ali i na termogeni kapacitet mrkih adipocita.

5.1.2 STRUKTURNO REMODELIRANJE MITOHONDRIJA

Naši rezultati su pokazali da Ca-SANDOZ tretman izaziva pojavu izrazito krupnih, više desetina puta uvećanih mitohondrija (megamitohondrija) u odnosu na kontrolnu grupu. Megamitohondrije se u literaturi najčešće opisuju u različitim patološkim stanjima ili poremećenim fiziološkim uslovima (Chedid i sar., 1980; Sun i sar., 1969), najčešće u jetri i mišićima. Često se povezuju sa alkoholnim oboljenjem jetre, hepatičnom steatozom, ali i drugim oboljenjima (Iseri i Gottlieb, 1971; Petersen, 1977; Prieto i sar., 2005).

Predloženo je nekoliko mehanizama formiranja megamitohondrija. Hipertrofija pojedinačnih mitohondrija je utvrđena u jetri eksperimentalnih životinja hranjenih visokoproteinskom dijetom, uslijed povećanog metabolizma azota (Zaragoza i sar., 1987). Hloramfenikol indukuje formiranje megamitohondrija u hepatocitima, najvjerovatnije zbog inhibicije sinteze proteina u mitohondrijama (Albring i sar., 1975). Slobodni radikali iniciraju formiranje megamitohondrija kada prevazilaze enzimatski i neenzimatski sistem odbrane protiv ROS. Stopa potrošnje kiseonika i bioenergetski kapacitet megamitohondrija je često niži (Karbowski i sar., 1999; Shishido i sar., 2003; Wakabayashi i sar., 1997) ili čak ostaje u fiziološkim granicama (Wakabayashi i sar., 1984).

Kako TEM analiza nije pokazala patološke promjene u mitohondrijama i mrkim adipocitima, nije moguće utvrditi šta je uzrokovalo pojavljivanje megamitohondrija, pogotovo kada se imaju u vidu gore navedene kontroverze.

Pokazali smo da Ca-SANDOZ utiče na formiranje eritrocitnih egzovezikula sa elektron-gustim hemihromnim kompleksima u BAT. Hemihromni kompleksi (produkti degradacije hemoglobina) mogu se indukovati u eksperimentalnim uslovima (Waugh i Low, 1985) ali i u normalnim uslovima kao posljedica starenja ćelija (Sears i sar., 1975). Unos kataboličkih produkata hemoglobina, odnosno hemina, u izolovane mitohondrije dovodi do značajne inhibicije ATP-stimulisane degradacije produkata mitohondrijalne translacione mašinerije (Desautels i Dulos, 1994). Pretpostavlja se da hem igra značajnu ulogu u BAT mitohondriogenezi i to uticajem na sintezu i degradaciju proteina u mitohondrijama (Atamna i sar., 2002).

Naši rezultati pokazuju da Ca-SANDOZ smanjuje broj mitohondrija po jedinici površine mrkih adipocita, ali i da pomjera srednji dijametar mitohondrija ka višim vrijednostima, što je u

saglasnosti sa primjećenim procesom fuzije. Osim toga, stereološke analize su pokazale i povećanje volumenske gustine kristi u mitohondrijama životinja tretiranih Ca-SANDOZ. Navedeni rezultati su u saglasnosti sa studijama koje su pokazale da dolazi do povećanja broja kristi, ali i njene gustine, u mitohondrijama mrkih adipocita poslije izlaganja hladnoći (Goglia i sar., 1992; Petrovic i sar., 2008). Povećana volumenska gustina kristi, odnosno samo remodeliranje kristi, može biti odgovor na mitohondrijalnu fuziju čime se izbjegava "višak" membrane i održava gustina mitohondrijalnog matriksa (Gazaryan i Brown, 2007). Tokom remodeliranja mitohondrija, ćelije koriste razne strategije da bi povećale produkciju ATP, kao što su: uvećanje samih mitohondrija, povećanje ukupnog broja mitohondrija u ćeliji, povećanje volumenske gustine mitohondrija u ćeliji, a i povećanje površine membrana kristi mitohondrija. Širok dijapazon ćelija koristi te strategije tokom prelaza iz normalnog fiziološkog miljea u poremećeno stanje pod uticajem raznih farmakoloških ili toksikoloških tretmana, ili u razna patološka stanja (Perkins i sar., 2003; Smith i Ord, 1983). Remodeliranje mitohondrija je veoma važno za ulazak ćelije u apoptozu, prije svega za mobilizaciju *cyt c* iz kristi (Scorrano i sar., 2002).

Volumenska gustina mitohondrija nije se promijenila nakon Ca-SANDOZ tretmana, što je u saglasnosti sa odsustvom promjene proteinskog sadržaja VDAC proteina, markera spoljašnje membrane mitohondrija. Isto tako, nivo kalneksina, markera ER membrana, nije se promijenio. Ovi rezultati ukazuju da kratak Ca-SANDOZ tretman ne stimuliše biogenezu mitohondrija niti ER, ali indukuje njihov rearanžman i formiranje brojnih kontakata među njima.

Mitohondrije su dinamičke organele koje stalno ulaze u proces fisije i fuzije, pa im ER obezbjeđuje stalan i dobro regulisan izvor fosfolipida, neophodan za integritet membrana i kristi (Jungalwala i Dawson, 1970; Osman i sar., 2011; Twig i sar., 2008). Povećan proteinski sadržaj Mfn2 ukazuje da je više Mfn2 proteina dostupno za uspostavljanje kontakata između mitohondrija i ER, što je već pokazano na fibroblastima embriona miševa (de Brito i Scorrano, 2008). Da bi se osigurao optimalni bioenergetski status i efikasna respiracija u mitohondrijama, kontakt između ER i mitohondrija je neophodan za konstantan unos Ca^{2+} putem $InsP_3$ receptora. Na taj način Ca^{2+} podupire oksidativnu fosforilaciju snabdjevanjem redukujućih ekvivalenata (Cardenas i sar., 2010). Osim toga, Ca^{2+} može da aktivira enzime Krebsovog ciklusa, kao što su piruvat dehidrogenaza, α -ketoglutarat i izocitrat dehidrogenaza (Hayashi i sar., 2009; Denton i sar., 1975), povećavajući protok kroz Krebsov ciklus. Štaviše, fuzija mitohondrija može imati i ulogu u zaštiti od oštećenja mitohondrijalne DNK (Chen i sar., 2005) uslijed povećane produkcije ROS koja nastaje kao rezultat povećane respiratorne

aktivnosti (Balaban i sar., 2005; Li i sar., 2013) i oksidacije masnih kiselina (Rosca i sar., 2012; Schonfeld i Wojtczak, 2012).

Analiza na nivou konfokalne mikroskopije je pokazala višu stopu kolokalizacije između aktivnih mitohondrija i ER u mrkim adipocitima grupa tretiranih Ca-SANDOZ, što ukazuje na povećan broj kontakata između te dvije organele, vjerovatno zbog povećane potrebe za Ca^{2+} interorganelarnim *crosstalk*, kao što je ranije opisano (Jeyaraju i sar., 2009; Walter i Hajnoczky, 2005). Viši mitohondrijalni membranski potencijal je primjećen u Ca-SANDOZ grupi, ukazujući na povećan unos Ca^{2+} u mitohondrije, što je u saglasnosti sa studijama koje su pokazale da je visok mitohondrijalni membranski potencijal neophodan za unos Ca^{2+} u mitohondrije (Rottenberg i Scarpa, 1974; Hajnoczky i sar., 1995; Kirichok i sar., 2004).

5.1.3 POVEĆANJE TERMOGENOG KAPACITETA MRKIH ADIPOCITA

Imunohistohemijska i Western Blot analiza su pokazale povećanje ekspresije UCP₁ proteina nakon Ca-SANDOZ tretmana, što vodi do povećane termogeneze (Bouillaud i sar., 1984; Bukowiecki i sar., 1986; Matthias i sar., 2000). Broj kristi, u kojima su komponente oksidativne fosforilacije smještene (Benard i Rossignol, 2008), je povećan što je u vezi sa pojačanom aktivnošću elektron transportnog lanca i pojačanim "curenjem" protona putem UCP₁ dekluplirajućeg mehanizma. Međutim, tačni detalji ovog procesa još nisu razjašnjeni (Jezek i sar., 2010; Divakaruni i Brand, 2011; Casteilla i sar., 2012).

Pokazana pojačana lipoliza pod Ca-SANDOZ tretmanom, na osnovu stereološke analize lipidnih tijela, u saglasnosti je sa procesom adaptivne termogeneze, gdje kateholaminima-stimulisana lipoliza obezbjeđuje masne kiseline za produkciju toplote u odgovoru na hladnoću ili prekomjernu ishranu (Souza i sar., 2007). Isto tako, uslijed povećane lipolize, dolazi i do smanjenja zapremine samih mrkih adipocita, što se uočava u smanjenju volumenske gustine mrkih adipocita u BAT.

Mogući mehanizmi povoljnog efekta kalcijuma na tjelesnu težinu su istraženi korišćenjem i animalnih i humanih modela (Schrager, 2005). Osim toga, Marotte i sar. (2014) su pokazali da smanjen unos kalcijuma može dovesti do povećanja tjelesne težine, pogotovo kod pacova sklonih gojaznosti. Kod ljudi, brojne studije su pokazale da visok unos kalcijuma ima efekat na gubitak tjelesne težine (Davies i sar., 2000; Zemel, 2002; Parikh i Yanovski, 2003; Teegarden, 2003; Zemel i sar., 2004). U slučaju ishrane bogate kalcijumom, predložena su dva mehanizma: 1) inhibicija lipogeneze i stimulacija lipolize supresijom cirkulirajućeg $1\alpha, 25$ -dihidroksiholekalciferola (Zemel i sar., 2000; Sun i Zemel, 2004; Sun i sar., 2007; He i sar.,

2011; Nobre i sar., 2011); i 2) povećanje fekalne ekskrecije masti formiranjem nerastvorljivih soli kalcijuma i masnih kiselina (Jacobsen i sar., 2005; Lorenzen i sar., 2007). Naši rezultati sugeriraju da ishrana bogata kalcijumom ima povoljan efekat na kontrolu ili gubitak tjelesne težine, i to povećanjem termogenog kapaciteta, tako da se na osnovu njih može postulirati i treći mehanizam: ishrana bogata kalcijumom utiče na smanjenje tjelesne težine povećanjem termogenog kapaciteta mrkih adipocita, i kao rezultat toga, povećanjem lipolize. Posebna vrijednost ovih rezultata leži u tome da, iako su dobijeni na modelu pacova, i s obzirom na postojanje BAT i kod ljudi ukazuju na potencijalni benefit tretmana kalcijumskim suplementima i u stanjima gojaznosti i dijabetesa tipa II.

5.2 TRETMAN INSULINOM

5.2.1 MODULACIJA KOMPLEKSA ELEKTRON TRANSPORTNOG LANCA I CYT C

Akutni tretman insulinom stimuliše proteinsku ekspresiju gotovo svih analiziranih kompleksa elektron transportnog lanca, pogotovo u grupama tretiranom niskom dozom. Poznato je da insulin stimuliše unos glukoze u mrke adipocite *in vitro* (Klein i sar., 2002), glodara (Inokuma i sar., 2005) i ljudi *in vivo* (Orava i sar., 2011). Pošto povećan unos glukoze vodi do povećane raspoloživosti acetyl-CoA, koji je dobijen iz piruvata i koji ulazi u Krebsov ciklus u vidu citrata, može se pretpostaviti da povećan nivo supstrata kompleksa I i kompleksa II (NADH, odnosno sukcinat) povećava aktivnost elektron transportnog lanca.

Sa druge strane, hronični tretman insulinom smanjuje proteinsku ekspresiju kompleksa I, III i cyt c. Moguće objašnjenje je da hronični insulinom stimulirani unos glukoze može dovesti do previsokog nivoa NADH koja se više ne može efikasno ukloniti elektron transportnim lancem, pri čemu dolazi do povećanja mitohondrijalnog protonskog gradijenta, i posljedično, pojedini elektroni se prenose do kiseonika formirajući slobodne radikale (Murphy, 2009). Čelije mogu da smanje formiranje ROS i to supresijom produkcije NADH ili spriječavanjem ulaska energetskih supstrata u mitohondrije (Van Gaal i sar., 2006).

Ekspresija kompleksa II povećana je hroničnom primjenom niske doze insulina, a smanjena primjenom visoke doze. Ta očigledna nedosljednost može nastati kao rezultat dvostruke uloge kompleksa II, koji povezuje elektron transportni lanac i Krebsov ciklus, gdje se sukcinat oksiduje u fumarat.

Različiti ćelijski modeli su pokazali da insulin stimuliše produkciju vodonik peroksida, molekula koji ima veoma značajnu ulogu u insulinskoj signalizaciji (Mahadev i sar., 2001; Yang

i sar., 2003; Pi i sar., 2007), čak i u mrkim adipocitima (May i de Haen, 1979). Pokazano je da je produkcija H_2O_2 značajno viša pri oksidaciji sukcinata nego glutamata/piruvata, i to u izolovanim mitohondrijama iz mozga pacova, srca i skeletnih mišića (Hansford i sar., 1997; Liu i sar., 2002; Han i sar., 2003; Kudin i sar., 2004; Hirst i sar., 2008). U mitohondrijama respirirajućim na sukcinatu, većina superoksida se proizvodi u kompleksu II (Quinlan i sar., 2012) a i kompleksu I tokom reverznog transporta elektrona od kompleksa II (Gyulhandanyan i Pennefather, 2004; Lambert i sar., 2007; Lee i sar., 2011). *In vitro* istraživanja na neuronima su pokazala da insulinom stimulirana produkcija H_2O_2 dovodi do autofosforilacije insulinskog receptora u maniru "sve ili ništa" (Storozhevkyh i sar., 2007; Persiyantseva i sar., 2013), rezultujući u povećanoj aktivnosti receptora asociiranih sa tirozin kinazom (Wei i sar., 1995). Takođe, u prisustvu insulina u skeletnim mišićima, H_2O_2 antagonizuje insulinsku signalizaciju aktivacijom različitih serin/treonin kinaza, rezultujući u insulinskoj rezistenciji (Henriksen, 2013).

Interesantno, proteinska ekspresija kompleksa IV je povećana pri hroničnim tretmanima insulinom, dok je ekspresija većine analiziranih kompleksa smanjena. Nema literaturnih podataka o efektu insulina na ekspresiju kompleksa IV u mrkim adipocitima, prema tome, ovo je prva studija koja analizira efekat insulina na kompleks IV mrkih adipocita. Skoro je objavljeno da je snižena aktivnost kompleksa IV povezana sa pojačanom osjetljivošću na insulin i insulinsku signalizaciju, ali i povećanu biogenezu mitohondrija u WAT miševa kojima nedostaje Surf1 (Deepa i sar., 2013). Kod pacova, povećanje ekspresije kompleksa IV korišćenjem agonista za β estrogenske receptore inhibira apoptotski signal u mitohondrijama (Hsieh i sar., 2006). Mi smo pokazali da hronični tretman visokom dozom insulina indukuje apoptozu mrkih adipocita (Korac i sar., 1999). Zajedno, ovi podaci sugerišu da mrki adipociti mogu povećati ekspresiju kompleksa IV radi smanjenja osjetljivosti na insulin, ali i da povećaju šansu za preživljavanjem u poremećenim fiziološkim uslovima uzrokovanih hiperinsulinemijom.

5.2.2 MODULACIJA ATP SINTAZE I IF₁

Naša studija pokazuje da akutna doza insulina stimuliše ekspresiju ATP sintaze, što je u saglasnosti sa povećanom ekspresijom kompleksa elektron transportnog lanca. To povećanje ekspresije kompleksa elektron transportnog lanca bi vodilo do povećane translokacije protona kroz unutrašnju mitohondrijalnu membranu, i do povećane aktivnosti ATP sintaze kuplovane sa protonskim gradijentom. Takođe, hronični tretman insulinom smanjuje ekspresiju ATP sintaze kao i neke druge komponente elektron transportnog lanca (kompleksi I, III, cyt c i pri visokoj

dozi kompleks II), što može da bude posljedica smanjenja efikasnosti translokacije protona od strane drugih kompleksa. Alternativno, to smanjenje ekspresije ATP sintaze može biti posljedica povećane ekspresije UCP₁ proteina, pošto je poznato je da je smanjenje ekspresije ATP sintaze povezano sa povećanjem ekspresije UCP₁ u BAT, pogotovo tokom izlaganja miševa hladnoći ili tokom razvića BAT (Houstek i Drahot, 1977; Houstek i sar., 1991; Kramarova i sar., 2008).

Vrlo zanimljiv podatak iz naše studije je povećana ekspresija IF₁, bez obzira na dozu ili dužinu tretmana insulinom. U eksperimentu sa vezikulama sa invertovanom unutrašnjom membranom mitohondrija jetre pacova, Schwerzmann i Pedersen (1986) su pokazali da IF₁ inhibira tranziciju od ATP sintazne do ATPazne aktivnosti u prisustvu dekaplujućih agenasa, kao što su karbonilcijanid-p-trifluorometoksifenilhidrazon (FCCP) i 2,4-dinitrofenol (DNP). Proteomska analiza BAT miševa izlaganih hladnoći pokazala je dvostruko povećanje ekspresije IF₁, i autori su sugerisali da povećanje ekspresije IF₁ možda služi da smanji hidrolizu ATP u mitohondrijama mrkih adipocita sa povećanim termogenim kapacitetom (Forner i sar., 2009). Pretpostavlja se da IF₁ direktno interaguje sa ATP sintazom, i pokazano je da može povećati stopu oksidativne fosforilacije ćelija osteosarkoma, i to stimulacijom katalitičke aktivnosti ATP sintaze ili poboljšanjem strukture mitohondrijalnih kristi (Barbato i sar., 2015). U ćelijama kancera, prekomjerna ekspresija IF₁ stimuliše aerobnu glikolizu i inhibira oksidativnu fosforilaciju (Sanchez-Cenizo i sar., 2010). Prekomjerna ekspresija IF₁ u ćelijama kancera debelog crijeva dovodi do mitohondrijalne hiperpolarizacije i prema tome, povećane produkcije ROS (Formentini i sar., 2012), ali je takođe povezana i sa očuvanjem mitohondrijalne morfologije i ultrastrukture ograničavajući apoptotski signal spriječavanjem oslobađanja cyt c (Faccenda i sar., 2013).

Prema tome, insulin stimuliše metaboličko reprogramiranje, vodeći ka sniženoj aktivnosti ATP sintaze i povećanoj produkciji ROS zbog mitohondrijalne hiperpolarizacije. Promjene u ekspresiji različitih proteinskih kompleksa mogu biti rezultat kompenzatornih mehanizama između različitih mitohondrijalnih respiratornih kompleksa (Havlickova Karbanova i sar., 2012; Kovarova i sar., 2012; Yamamori i sar., 2012; Claus i sar., 2013). Iz naših rezultata proizilazi da insulin uzrokuje promjene u ekspresiji glavnih proteina mitohondrija putem finog metaboličkog reprogramiranja mrkih adipocita, gdje mitohondrijalna hiperpolarizacija remeti bioenergetski kapacitet i povećava termogeni kapacitet.

5.2.3 MODULACIJA UCP PROTEINA

Hipoteza po kojoj insulin uzrokuje promjene u ekspresiji mitohondrijalnih kompleksa putem finog metaboličkog reprogramiranja mrkih adipocita, dodatno je potkrijepljena efektima insulina na ekspresiju dekuplujućih proteina. Povećanje ekspresije UCP₁ rezultuje u povećanom termogenom kapacitetu mrkih adipocita (Matthias i sar., 2000), kao i u dekuplovanju oksidativne fosforilacije. To je u saglasnosti sa primjećanim smanjenjem ekspresije ATP sintaze i povećanjem ekspresije IF₁, o čemu smo diskutovali ranije. UCP₁ je uključen u rasipanje protonskog gradijenta produkujući toplotu, i upravo zbog toga, ATP sintaza produkuje manje ATP. Tokom tog procesa, mrki adipociti stimulišu ekspresiju IF₁ proteina u cilju sprječavanja nepoželjne degradacije ATP od strane ATP sintaze. Analiza BAT miševa, kod kojih je indukovana dijabetes streptozotocinom, pokazala je veliko smanjenje proteinskog sadržaja UCP₁, ali i da je tretman insulinom tih miševa doveo do dvostrukog povećanja proteinskog sadržaja UCP₁ u BAT, što ukazuje da insulin ima važnu ulogu u UCP₁ indukovanoj termogenezi (Geloan i Trayhurn, 1990).

Himms-Hagen i Harper (2001) su postavili hipotezu da primarna uloga UCP₃ proteina nije povećanje termogenog kapaciteta mrkih adipocita, već regulacija metabolizma masnih kiselina u ćeliji, što je i potvrđeno u eksperimentima sa bijelim ruskim hrčcima (Liebig i sar., 2004), a takođe i u mišićnim ćelijama (Bezaire i sar., 2005; MacLellan i sar., 2005). Osim toga, UCP₃ transportuje van mitohondrijalnog matriksa anjone masnih kiselina koje se ne mogu oksidovati (Schrauwen i sar., 2003) da bi se spriječilo oštećenje mitohondrija lipidima, odnosno lipidna peroksidacija (Schrauwen i Hesselink, 2004). Brand i Esteves (2005) su zaključili da UCP₂ i UCP₃ generalno nisu odgovorni za adaptivnu termogenezu, već su veoma značajni za umjereno dekuplovanje (engl. *mild uncoupling*), na taj način smanjujući produkciju ROS, i štiteći ćeliju od ROS indukovano oštećenja. Iako dobijene rezultate UCP₂ ekspresije uzimamo sa rezervom (jer proizvođač nije testirao specifičnost anti-UCP₂ antitijela), smanjenje proteinske ekspresije UCP₂ u hroničnom tretmanu visokom dozom insulina, više nego u slučaju smanjenja UCP₃ ekspresije u hroničnom tretmanu niskom dozom, je moguća posljedica mitohondrijalnog oštećenja i formiranja lipofuscina porijeklom iz mitohondrija, kao što smo ranije pokazali (Markelic i sar., 2013).

5.2.4 HETEROGENOST MRKIH ADIPOCITA

Iako Western Blot analiza mitohondrijama bogate frakcije daje najbolji uvid u promjenu ekspresije proteina uključenih u uspostavljanje i održanje bioenergetskog i termogenog kapaciteta mrkih adipocita, tačna ćelijska i mitohondrijalna lokalizacija ostaje nepoznata. Da bi rasvijetlili ovaj aspekt remodeliranja mitohondrijalne populacije u BAT nakon tretmana insulinom, analizirali smo *in vivo* moguću kolokalizaciju, ali i prisustvo i lokalizaciju mrkih adipocita koji eksprimiraju analizirane proteine, odnosno komplekse. Harlekin efekat i pretpostavljeni mozaicizam termogenog kapaciteta mrkih adipocita je dobro poznat (Cinti i sar., 2002). Imajući ovo u uvidu, mi smo željeli da utvrdimo da li mrki adipociti takođe pokazuju Harlekin efekat u slučaju kompleksa elektron transportnog lanca i ATP sintaze u ćelijama sa različitim bioenergetskim profilom, i to primjenom fluorescentne odnosno konfokalne mikroskopije.

Konfokalna mikroskopija je pokazala prisustvo UCP₁-pozitivnih, a i UCP₁-negativnih mrkih adipocita u BAT. Ta dihotomija je posebno izražena u kontrolnim grupama, što ukazuje na Harlekin efekat (Cinti i sar., 2002). Međutim, utvrdili smo heterogenost imunofluorescencije u slučaju analize kompleksa elektron transportnog lanca, što implicira da mrki adipociti mogu imati različite bioenergetske profile. Koekspresija, a i paralelne promjene u imunofluorescenciji su primjećene i u grupama tretiranim insulinom. Značajne promjene su vidljive u različitim mrkim adipocitima, što ukazuje da insulin modulira ekspresiju UCP₁ proteina, odnosno kompleksa elektron transportnog lanca. Takođe, imunofluorescencija je pokazala homogeniji obrazac imunoekspresije u grupi hronično tretiranoj visokom dozom insulina.

Ova studija je pokazala da insulin modulira komplekse elektron transportnog lanca i UCP₁ proteina, i prema tome bioenergetski i termogeni kapacitet mrkih adipocita pacova modulacijom ekspresije ključnih proteina mitohondrija. Pokazali smo da su ključni bioenergetski proteini (kompleksi I, II, III, IV i ATP sintaza) i termogeni protein UCP₁ imunolokalizovani ne samo u različitim mrkim adipocitima, već isto tako i u različitim mitohondrijalnim populacijama unutar samog mrkog adipocita. Naši rezultati ukazuju na funkcionalnu heterogenost mitohondrija u mrkim adipocitima, što je utvrđeno u drugim tipovima ćelija (Collins i sar., 2002; Wikstrom i sar., 2007; Kuznetsov i Margreiter, 2009). Dominantno prisustvo UCP₁ ili kompleksa elektron transportnog lanca, odnosno ATP sintaze, u mitohondrijama može se objasniti razlikom u bioenergetskom ili termogenom kapacitetu u različitim mrkim adipocitima ili čak u različitim dijelovima BAT. Mitohondrije, koje sadrže kolokalizovane bioenergetske, odnosno termogene proteine oko lipidnih tijela, pa čak i u mrkim

adipocitima sličnim adipocitima WAT, ukazuju na metabolički mozaicizam.

Posmatrane paralelne, ali i suprotne promjene u ekspresiji ATP sintaze i njenog inhibitora IF₁ pod akutnim, odnosno hroničnim tretmanom, je vrlo značajno. Ovo je i prvi podatak o ekspresiji IF₁ u mrkim adipocitima nakon tretmana insulinom. Kako funkcionalni značaj pretpostavljene koregulacije nije još uvijek jasan, pretpostavlja se da akutni tretman insulinom povećava produkciju ATP, dok je obrnut slučaj za hronični tretman insulinom. Preokret u korist produkcije ATP ostaje pod kontrolom IF₁ da bi se spriječila prekomjerna produkcija ROS i nepotrebna potrošnja ATP koje bi vodile do oštećenja mitohondrija ili mrkih adipocita. Da bi ispunili tu ulogu, IF₁ je kolokalizovan sa ATP sintazom, kao što smo i pokazali. Veoma visoka, akutna doza insulina uzrokuje pad ekspresije ATP sintaze i IF₁ u poređenju sa akutnom niskom dozom insulina, što se dalje intenzivira hroničnim tretmanom u slučaju ATP sintaze. Kao što je već opisano, pad u produkciji energije i akumulacija ROS pri insulinskom tretmanu vodi do peroksidativnog oštećenja mitohondrija, lipofuscinogeneze (Markelic i sar., 2013) i apoptoze mrkih adipocita (Korac i sar., 1999).

Dobijeni rezultati mogu da rasvijetle ulogu insulina ne samo u energetske homeostazi, već i u raznim metaboličkim poremećajima u kojima insulin može biti glavni uzrok, kao što su hiperinsulinemija, insulinska rezistencija i dijabetes. Takođe, oni mogu ukazati na nove terapijske intervencije koje kao ciljni organ koriste BAT. Veoma je interesantan i skorašnji podatak da mitohondrijalna struktura može da odredi efikasnost respiracije (Lapuente-Brun i sar., 2013; Cogliati i sar., 2013), kao i da su UCP4 i ATP sintaza prostorno udaljeni jedan od drugog u mitohondrijama neurona (Klotzsch i sar., 2015). Naši rezultati su u saglasnosti sa ovim podacima, i ukazuju na jedan nov, budući pravac u našim istraživanjima - utvrđivanje *in vivo* kolokalizacije svih ključnih molekula bioenergetskog i termogenog kapaciteta u mitohondrijama BAT. Smatramo da će to doprinjeti rasvijetljavanju uloge insulina u razvoju insulinske rezistencije ali i doprinjeti potencijalnim mogućnostima liječenja metaboličkog sindroma, naročito imajući u vidu pokazane efekte kalcijuma i insulina na mitohondrije BAT.

6 | Zaključci

Ova doktorska disertacija je pokazala da se mitohondrije mrkih adipocita odlikuju izuzetnom plastičnošću u strukturnom, ali i u funkcionalnom smislu, i to primjenom kalcijuma, odnosno insulina.

Eksperimentalni tretman sa Ca-SANDOZ je pokazao:

Povećanje koncentracije Ca^{2+} u mrkim adipocitima. Sam Ca-SANDOZ tretman dovodi do povećanja nivoa Ca^{2+} u mrkim adipocitima, što je pokazano Alizarin Red S bojenjem i lokalizacijom kalijum piroantimonatom. Predložen je alternativni put unosa kalcijuma egzovezikulacijom eritrocita.

Strukturno remodeliranje mitohondrija. Analize proteinske ekspresije, kao i ultrastrukturne i stereološke analize su pokazale formiranje megamitohondrija, povećanje mitohondrijalne fuzije i remodeliranje unutrašnje arhitekture mitohondrija, odnosno povećanje volumenske gustine kristi nakon Ca-SANDOZ tretmana.

Povećanje komunikacije između mitohondrija i endoplazminog retikuluma. Proteinska ekspresija Mfn2 proteina, ultrastrukturna analiza i kolokalizaciona studija su pokazale povećanje intimnih kontakata između mitohondrija i ER.

Povećanje termogenog kapaciteta mrkih adipocita. Analiza proteinske ekspresije i imunohistohemija na UCP1 protein su pokazali da dolazi do povećanja termogenog kapaciteta mrkih adipocita.

Eksperimentalni tretman insulinom je pokazao:

*Modulaciju ekspresije kompleksa elektron transportnog lanca i *cyt c*.* Pokazano je da insulin ima značajan efekat na proteinsku ekspresiju svih komponenti elektron transportnog lanca, i taj efekat zavisi od primjenjene doze insulina i dužine tretmana.

Modulaciju ekspresije i aktivnosti ATP sintaze i ekspresije inhibitornog faktora 1. Akutna doza insulina je dovela do povećanja proteinske ekspresije ATP sintaze i IF1, a hronična doza je dovela do smanjenja proteinske ekspresije ATP sintaze, a povećanja proteinske ekspresije IF1. Osim toga, aktivnost ATP sintaze je povećana primjenom akutne, a smanjena primjenom hronične doze

insulina.

Modulaciju ekspresije UCP proteina. Hronični tretman insulinom dovodi po povećanja proteinske ekspresije UCP₁ proteina, što ukazuje da dolazi do povećanja termogenog kapaciteta mrkih adipocita. Osim toga, insulin utiče i na proteinsku ekspresiju UCP₂ i UCP₃ proteina.

Heterogenost mrkih adipocita. Pokazano je da se mrki adipociti ne odlikuju samo dobro poznatim Harlekin efektom u slučaju UCP₁ proteina, već i da se odlikuju heterogenošću ekspresije kompleksa elektron transportnog lanca, cyt c, ATP sintaze i IF₁, što je i pokazano imunofluorescentnim metodima.

Mitohondrijalni mozaicizam. Analiza na nivou konfokalne mikroskopije je pokazala da postoji razlika u imunoekspresiji bioenergetskih i termogenih proteina između pojedinačnih mitohondrija, što ukazuje da postoji i heterogenost u pogledu bioenergetskog i termogenog kapaciteta ovih organela, ne samo na nivou tkiva već i na nivou jednog mrkog adipocita.

Literatura

- ACIN-PEREZ, R., FERNANDEZ-SILVA, P., PELEATO, M. L., PEREZ-MARTOS, A. i ENRIQUEZ, J. A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*, 32(4):529–539.
- AGGELER, R., COONS, J., TAYLOR, S. W., GHOSH, S. S., GARCIA, J. J., CAPALDI, R. A. i MARUSICH, M. F. (2002). A functionally active human F₁F₀ ATPase can be purified by immunocapture from heart tissue and fibroblast cell lines. Subunit structure and activity studies. *J Biol Chem*, 277(37):33906–33912.
- ALBRING, M., RADSAK, K. i THOENES, W. (1975). Chloramphenicol-induced giant hepatic mitochondria. *Naturwissenschaften*, 62(1):43–44.
- ALLEN, R. D. (1995). Membrane tubulation and proton pumps. *Protoplasma*, 189(1-2):1–8.
- ALLEN, R. D., SCHROEDER, C. C. i FOK, A. K. (1989). An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J Cell Biol*, 108(6):2233–2240.
- ALTMANN, R. (1894). *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Verlag Von Veit & Comp, Leipzig, 2. izdanje.
- AMCHENKOVA, A. A., BAKEEVA, L. E., CHENTSOV, Y. S., SKULACHEV, V. P. i ZOROV, D. B. (1988). Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J Cell Biol*, 107(2):481–495.
- ANDERSSON, U., HOUSTEK, J. i CANNON, B. (1997). ATP synthase subunit c expression: physiological regulation of the P₁ and P₂ genes. *Biochem J*, 323 (Pt 2):379–385.
- ANDREYEV, A., BONDAREVA, T. O., DEDUKHOVA, V. I., MOKHOVA, E. N., SKULACHEV, V. P., TSOFINA, L. M., VOLKOV, N. I. i VYGODINA, T. V. (1989). The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. *Eur J Biochem*, 182(3):585–592.

- ANTON, F., DITTMAR, G., LANGER, T. i ESCOBAR-HENRIQUES, M. (2013). Two deubiquitylases act on mitofusin and regulate mitochondrial fusion along independent pathways. *Mol Cell*, 49(3):487–498.
- AQUILA, H., LINK, T. A. i KLINGENBERG, M. (1985). The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J*, 4(9):2369–2376.
- ARCHER, S. L. (2013). Mitochondrial dynamics—mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med*, 369(23):2236–2251.
- AREA-GOMEZ, E., de GROOF, A. J., BOLDOGH, I., BIRD, T. D., GIBSON, G. E., KOEHLER, C. M., YU, W. H., DUFF, K. E., YAFFE, M. P., PON, L. A. i SCHON, E. A. (2009). Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *Am J Pathol*, 175(5):1810–1816.
- ARSENIJEVIC, D., ONUMA, H., PECQUEUR, C., RAIMBAULT, S., MANNING, B. S., MIROUX, B., COUPLAN, E., ALVES-GUERRA, M. C., GOUBERN, M., SURWIT, R., BOULLAUD, F., RICHARD, D., COLLINS, S. i 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(4):435–439.
- ATAMNA, H., WALTER, P. B. i AMES, B. N. (2002). The role of heme and iron-sulfur clusters in mitochondrial biogenesis, maintenance, and decay with age. *Arch Biochem Biophys*, 397(2):345–353.
- ATGIE, C., MARETTE, A., DESAUTELS, M., TULP, O. i BUKOWIECKI, L. J. (1993). Specific decrease of mitochondrial thermogenic capacity in brown adipose tissue of obese SHR/N-cp rats. *Am J Physiol*, 265(6 Pt 1):C1674–80.
- BALABAN, R. S., NEMOTO, S. i FINKEL, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4):483–495.
- BARADARAN, R., BERRISFORD, J. M., MINHAS, G. S. i SAZANOV, L. A. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 494(7438):443–448.
- BARBATO, S., SGARBI, G., GORINI, G., BARACCA, A. i SOLAINI, G. (2015). The inhibitor protein (IF1) of the F1Fo-ATPase modulates human osteosarcoma cell bioenergetics. *J Biol Chem*, 290(10):6338–6348.

- BEHBAHANI, H., SHABALINA, I. G., WIEHAGER, B., CONCHA, H., HULTENBY, K., PETROVIC, N., NEDERGAARD, J., WINBLAD, B., COWBURN, R. F. i ANKARCORONA, M. (2006). Differential role of Presenilin-1 and -2 on mitochondrial membrane potential and oxygen consumption in mouse embryonic fibroblasts. *J Neurosci Res*, 84(4):891–902.
- BENARD, G. i ROSSIGNOL, R. (2008). Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal*, 10(8):1313–1342.
- BENDA, C. (1898). Über die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertrebraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. *Arch Anat Physiol*, 73:393–398.
- BEREITER-HAHN, J. (1990). Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol*, 122:1–63.
- BERRIDGE, M. J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32(5-6):235–249.
- BERRY, E. A. i TRUMPOWER, B. L. (1985). Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc₁ and cytochrome c-aa₃ complexes. *J Biol Chem*, 260(4):2458–2467.
- BEZAIRE, V., SPRIET, L. L., CAMPBELL, S., SABET, N., GERRITS, M., BONEN, A. i HARPER, M. E. (2005). Constitutive UCP₃ overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. *FASEB J*, 19(8):977–979.
- BO, H., JIANG, N., MA, G., QU, J., ZHANG, G., CAO, D., WEN, L., LIU, S., JI, L. L. i ZHANG, Y. (2008). Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. *Free Radic Biol Med*, 44(7):1373–1381.
- BOEHM, E. A., JONES, B. E., RADDA, G. K., VEECH, R. L. i CLARKE, K. (2001). Increased uncoupling proteins and decreased efficiency in palmitate-perfused hyperthyroid rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(3):H977–83.
- BOIRIE, Y., SHORT, K. R., AHLMAN, B., CHARLTON, M. i NAIR, K. S. (2001). Tissue-specific regulation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis rates by insulin. *Diabetes*, 50(12):2652–2658.
- BORDICCHIA, M., LIU, D., AMRI, E. Z., AILHAUD, G., DESSI-FULGHERI, P., ZHANG, C., TAKAHASHI, N., SARZANI, R. i COLLINS, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38

- MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest*, 122(3):1022–1036.
- BORNHOVD, C., VOGEL, F., NEUPERT, W. i REICHERT, A. S. (2006). Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F₁F₀-ATP synthase supracomplexes. *J Biol Chem*, 281(20):13990–13998.
- BOSS, O., HAGEN, T. i LOWELL, B. B. (2000). Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes*, 49(2):143–156.
- BOSS, O., SAMEC, S., PAOLONI-GIACOBINO, A., ROSSIER, C., DULLOO, A., SEYDOUX, J., MUZZIN, P. i GIACOBINO, J. P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett*, 408(1):39–42.
- BOUCHER, J., MORI, M. A., LEE, K. Y., SMYTH, G., LIEW, C. W., MACOTELA, Y., ROURK, M., BLUHER, M., RUSSELL, S. J. i KAHN, C. R. (2012). Impaired thermogenesis and adipose tissue development in mice with fat-specific disruption of insulin and IGF-1 signalling. *Nat Commun*, 3:902.
- BOUILLAUD, F., RICQUIER, D., MORY, G. i THIBAUT, J. (1984). Increased level of mRNA for the uncoupling protein in brown adipose tissue of rats during thermogenesis induced by cold exposure or norepinephrine infusion. *J Biol Chem*, 259(18):11583–11586.
- BOUILLAUD, F., WEISSENBAACH, J. i RICQUIER, D. (1986). Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown fat uncoupling protein. *J Biol Chem*, 261(4):1487–1490.
- BOUSHEL, R., GNAIGER, E., SCHJERLING, P., SKOVBRØ, M., KRAUNSOE, R. i DELA, F. (2007). Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia*, 50(4):790–796.
- BOYER, P. D. (1997). The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem*, 66:717–749.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254.
- BRAND, M. D. i ESTEVES, T. C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab*, 2(2):85–93.

- BRANDEN, G., GENNIS, R. B. i BRZEZINSKI, P. (2006). Transmembrane proton translocation by cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1757(8):1052–1063.
- BRASCHI, E., ZUNINO, R. i MCBRIDE, H. M. (2009). MAPL is a new mitochondrial SUMO E₃ ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep*, 10(7):748–754.
- BRONNIKOV, G. E., ZHANG, S. J., CANNON, B. i NEDERGAARD, J. (1999). A dual component analysis explains the distinctive kinetics of cAMP accumulation in brown adipocytes. *J Biol Chem*, 274(53):37770–37780.
- BUKOWIECKI, L. J., GELOEN, A. i COLLET, A. J. (1986). Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *Am J Physiol*, 250(6 Pt 1):C880–7.
- BUZHYNSKY, N., SENS, P., PRIMA, V., STURGIS, J. N. i SCHEURING, S. (2007). Rows of ATP synthase dimers in native mitochondrial inner membranes. *Biophys J*, 93(8):2870–2876.
- CABEZON, E., ARECHAGA, I., JONATHAN, P., BUTLER, G. i WALKER, J. E. (2000). Dimerization of bovine F₁-ATPase by binding the inhibitor protein, IF₁. *J Biol Chem*, 275(37):28353–28355.
- CABEZON, E., MONTGOMERY, M. G., LESLIE, A. G. i WALKER, J. E. (2003). The structure of bovine F₁-ATPase in complex with its regulatory protein IF₁. *Nat Struct Biol*, 10(9):744–750.
- CADENAS, S., BUCKINGHAM, J. A., SAMEC, S., SEYDOUX, J., DIN, N., DULLOO, A. G. i BRAND, M. D. (1999). UCP₂ and UCP₃ rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett*, 462(3):257–260.
- CAMPANELLA, M., PARKER, N., TAN, C. H., HALL, A. M. i DUCHEN, M. R. (2009). IF₁: setting the pace of the F₁F_o-ATP synthase. *Trends Biochem Sci*, 34(7):343–350.
- CANNON, B. i LINDBERG, O. (1979). Mitochondria from brown adipose tissue: isolation and properties. *Methods Enzymol*, 55:65–78.
- CANNON, B. i NEDERGAARD, J. (1985). The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. *Essays Biochem*, 20:110–164.
- CANNON, B. i NEDERGAARD, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84(1):277–359.
- CANNON, B. i NEDERGAARD, J. (2008). Studies of thermogenesis and mitochondrial function in adipose tissues. *Methods Mol Biol*, 456:109–121.

- CARDENAS, C., MILLER, R. A., SMITH, I., BUI, T., MOLGO, J., MULLER, M., VAIS, H., CHEUNG, K. H., YANG, J., PARKER, I., THOMPSON, C. B., BIRNBAUM, M. J., HALLOWS, K. R. i FOSKETT, J. K. (2010). Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP₃ receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell*, 142(2):270–283.
- CASTEILLA, L., DEVIN, A., SALIN, B., AVERET, N. i RIGOLET, M. (2012). UCP₁ as a water/proton co-transporter. *Mitochondrion*, 12(4):480–481.
- CECCHINI, G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem*, 72:77–109.
- CHANCE, B. i WILLIAMS, G. R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem*, 217(1):409–427.
- CHAPPIE, J. S., MEARS, J. A., FANG, S., LEONARD, M., SCHMID, S. L., MILLIGAN, R. A., HINSHAW, J. E. i DYDA, F. (2011). A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell*, 147(1):209–222.
- CHEDID, A., JAO, W. i PORT, J. (1980). Megamitochondria in hepatic and renal disease. *Am J Gastroenterol*, 73(4):319–324.
- CHEN, H., CHOMYN, A. i CHAN, D. C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*, 280(28):26185–26192.
- CHEN, H., DETMER, S. A., EWALD, A. J., GRIFFIN, E. E., FRASER, S. E. i CHAN, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 160(2):189–200.
- CINTI, S., CANCELLO, R., ZINGARETTI, M. C., CERESI, E., DE MATTEIS, R., GIORDANO, A., HIMMS-HAGEN, J. i RICQUIER, D. (2002). CL_{316,243} and cold stress induce heterogeneous expression of UCP₁ mRNA and protein in rodent brown adipocytes. *J Histochem Cytochem*, 50(1):21–31.
- CIPOLAT, S., MARTINS DE BRITO, O., DAL ZILIO, B. i SCORRANO, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(45):15927–15932.
- CLAPHAM, J. C., ARCH, J. R., CHAPMAN, H., HAYNES, A., LISTER, C., MOORE, G. B., PIERCY, V., CARTER, S. A., LEHNER, I., SMITH, S. A., BEELEY, L. J., GODDEN, R. J., HERRITY, N., SKEHEL,

- M., CHANGANI, K. K., HOCKINGS, P. D., REID, D. G., SQUIRES, S. M., HATCHER, J., TRAIL, B., LATCHAM, J., RASTAN, S., HARPER, A. J., CADENAS, S., BUCKINGHAM, J. A., BRAND, M. D. i ABUIN, A. (2000). Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature*, 406(6794):415–418.
- CLAUS, C., SCHONEFELD, K., HUBNER, D., CHEY, S., REIBETANZ, U. i LIEBERT, U. G. (2013). Activity increase in respiratory chain complexes by rubella virus with marginal induction of oxidative stress. *J Virol*, 87(15):8481–8492.
- COGLIATI, S., FREZZA, C., SORIANO, M. E., VARANITA, T., QUINTANA-CABRERA, R., CORRADO, M., CIPOLAT, S., COSTA, V., CASARIN, A., GOMES, L. C., PERALES-CLEMENTE, E., SALVIATI, L., FERNANDEZ-SILVA, P., ENRIQUEZ, J. A. i SCORRANO, L. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, 155(1):160–171.
- COHEN, M. M., LÉBOUCHER, G. P., LIVNAT-LEVANON, N., GLICKMAN, M. H. i WEISSMAN, A. M. (2008). Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol Biol Cell*, 19(6):2457–2464.
- COLLINS, S. i BORDICCHIA, M. (2013). Heart hormones fueling a fire in fat. *Adipocyte*, 2(2):104–108.
- COLLINS, T. J., BERRIDGE, M. J., LIPP, P. i BOOTMAN, M. D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J*, 21(7):1616–1627.
- COLLINSON, I. R., RUNSWICK, M. J., BUCHANAN, S. K., FEARNLEY, I. M., SKEHEL, J. M., van RAAIJ, M. J., GRIFFITHS, D. E. i WALKER, J. E. (1994). Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F₁-ATPase. *Biochemistry*, 33(25):7971–7978.
- CONNOLLY, E., NANBERG, E. i NEDERGAARD, J. (1984). Na⁺-dependent, alpha-adrenergic mobilization of intracellular (mitochondrial) Ca²⁺ in brown adipocytes. *Eur J Biochem*, 141(1):187–193.
- CONNOLLY, E. i NEDERGAARD, J. (1988). Beta-adrenergic modulation of Ca²⁺ uptake by isolated brown adipocytes. Possible involvement of mitochondria. *J Biol Chem*, 263(22):10574–10582.

- COONEY, G. J., CATERSON, I. D. i NEWSHOLME, E. A. (1985). The effect of insulin and noradrenaline on the uptake of 2-[1-¹⁴C]deoxyglucose in vivo by brown adipose tissue and other glucose-utilising tissues of the mouse. *FEBS Lett*, 188(2):257–261.
- CRIBBS, J. T. i STRACK, S. (2009). Functional characterization of phosphorylation sites in dynamin-related protein 1. *Methods Enzymol*, 457:231–253.
- CROFTS, A. R. (2004). The cytochrome bc₁ complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol*, 66:689–733.
- CSORDAS, G., RENKEN, C., VARNAI, P., WALTER, L., WEAVER, D., BUTTLE, K. F., BALLA, T., MANNELLA, C. A. i HAJNOCZKY, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol*, 174(7):915–921.
- CZECH, M. P., LAWRENCE JR., J. C. i LYNN, W. S. (1974). Hexose transport in isolated brown fat cells. A model system for investigating insulin action on membrane transport. *J Biol Chem*, 249(17):5421–5427.
- DAVIES, K. M., ANSEMI, C., WITTIG, I., FARALDO-GOMEZ, J. D. i KUHLEBRANDT, W. (2012). Structure of the yeast F₁F_o-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(34):13602–13607.
- DAVIES, K. M., HEANEY, R. P., RECKER, R. R., LAPPE, J. M., BARGER-LUX, M. J., RAFFERTY, K. i HINDERS, S. (2000). Calcium intake and body weight. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(12):4635–4638.
- de BRITO, O. M. i SCORRANO, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456(7222):605–610.
- DE GIORGI, F., LARTIGUE, L. i ICHAS, F. (2000). Electrical coupling and plasticity of the mitochondrial network. *Cell Calcium*, 28(5-6):365–370.
- DEEPA, S. S., PULLIAM, D., HILL, S., SHI, Y., WALSH, M. E., SALMON, A., SLOANE, L., ZHANG, N., ZEVIANI, M., VISCOMI, C., MUSI, N. i VAN REMMEN, H. (2013). Improved insulin sensitivity associated with reduced mitochondrial complex IV assembly and activity. *FASEB J*, 27(4):1371–1380.
- DENTON, R. M. (2009). Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta*, 1787(11):1309–1316.

- DENTON, R. M., RANDLE, P. J., BRIDGES, B. J., COOPER, R. H., KERBEY, A. L., PASK, H. T., SEVERSON, D. L., STANSBIE, D. i WHITEHOUSE, S. (1975). Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase. *Mol Cell Biochem*, 9(1):27–53.
- DESAUTELS, M. i DULOS, R. (1994). Hemin inhibits protein synthesis and degradation in isolated brown adipose tissue mitochondria. *Can J Physiol Pharm*, 72(9):970–978.
- DIAO, J., ALLISTER, E. M., KOSHKIN, V., LEE, S. C., BHATTACHARJEE, A., TANG, C., GIACCA, A., CHAN, C. B. i WHEELER, M. B. (2008). UCP2 is highly expressed in pancreatic alpha-cells and influences secretion and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(33):12057–12062.
- DIVAKARUNI, A. S. i BRAND, M. D. (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology*, 26(3):192–205.
- DOLGACHEVA, L. P., ABZHALELOV, B. B., ZHANG, S. J., ZINCHENKO, V. P. i BRONNIKOV, G. E. (2003). Norepinephrine induces slow calcium signalling in murine brown preadipocytes through the beta-adrenoceptor/cAMP/protein kinase A pathway. *Cell Signal*, 15(2):209–216.
- DUDKINA, N. V., EUBEL, H., KEEGSTR, W., BOEKEMA, E. J. i BRAUN, H. P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(9):3225–3229.
- DUDKINA, N. V., KOURIL, R., PETERS, K., BRAUN, H. P. i BOEKEMA, E. J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7):664–670.
- DUDKINA, N. V., KUDRYASHEV, M., STAHLBERG, H. i BOEKEMA, E. J. (2011). Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(37):15196–15200.
- EBNER, S., BURNOL, A. F., FERRE, P., de SAINTAURIN, M. A. i GIRARD, J. (1987). Effects of insulin and norepinephrine on glucose transport and metabolism in rat brown adipocytes. Potentiation by insulin of norepinephrine-induced glucose oxidation. *Eur J Biochem*, 170(1-2):469–474.
- ECHTAY, K. S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins—what is their physiological role? *Free Radic Biol Med*, 43(10):1351–1371.
- EFREMOV, R. G. i SAZANOV, L. A. (2011). Structure of the membrane domain of respiratory complex I. *Nature*, 476(7361):414–420.

- ESTEVEZ, T. C. i BRAND, M. D. (2005). The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Biochim Biophys Acta*, 1709(1):35–44.
- EUBEL, H., JANSCH, L. i BRAUN, H. P. (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol*, 133(1): 274–286.
- FACCENDA, D., TAN, C. H., SERAPHIM, A., DUCHEN, M. R. i CAMPANELLA, M. (2013). IF1 limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelling. *Cell Death Differ*, 20(5):686–697.
- FAELBER, K., POSOR, Y., GAO, S., HELD, M., ROSKE, Y., SCHULZE, D., HAUCKE, V., NOE, F. i DAUMKE, O. (2011). Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature*, 477(7366):556–560.
- FASSHAUER, M., KLEIN, J., UEKI, K., KRIAUCIUNAS, K. M., BENITO, M., WHITE, M. F. i KAHN, C. R. (2000). Essential role of insulin receptor substrate-2 in insulin stimulation of Glut4 translocation and glucose uptake in brown adipocytes. *J Biol Chem*, 275(33):25494–25501.
- FEDORENKO, A., LISHKO, P. V. i KIRICHOK, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*, 151(2):400–413.
- FERNANDEZ MORAN, H., ODA, T., BLAIR, P. V. i GREEN, D. E. (1964). A Macromolecular Repeating Unit of Mitochondrial Structure and Function. Correlated Electron Microscopic and Biochemical Studies of Isolated Mitochondria and Submitochondrial Particles of Beef Heart Muscle. *J Cell Biol*, 22:63–100.
- FIGUEROA-ROMERO, C., INIGUEZ-LLUHI, J. A., STADLER, J., CHANG, C. R., ARNOULT, D., KELLER, P. J., HONG, Y., BLACKSTONE, C. i FELDMAN, E. L. (2009). SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. *FASEB J*, 23(11):3917–3927.
- FISLER, J. S. i WARDEN, C. H. (2006). Uncoupling proteins, dietary fat and the metabolic syndrome. *Nutr Metab*, 3:38.
- FLEURY, C., NEVEROVA, M., COLLINS, S., RAIMBAULT, S., CHAMPIGNY, O., LEVI-MEYRUEIS, C., BOUILLAUD, F., SELDIN, M. F., SURWIT, R. S., RICQUIER, D. i WARDEN, C. H. (1997).

- Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*, 15(3): 269–272.
- FORD, M. G., JENNI, S. i NUNNARI, J. (2011). The crystal structure of dynamin. *Nature*, 477(7366):561–566.
- FORMENTINI, L., SANCHEZ-ARAGO, M., SANCHEZ-CENIZO, L. i CUEZVA, J. M. (2012). The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response. *Mol Cell*, 45(6):731–742.
- FORNER, F., KUMAR, C., LUBER, C. A., FROMME, T., KLINGENSPOR, M. i MANN, M. (2009). Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell Metab*, 10(4):324–335.
- FREY, T. G. i MANNELLA, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25(7):319–324.
- FREY, T. G., RENKEN, C. W. i PERKINS, G. A. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta*, 1555(1-3):196–203.
- FREZZA, C., CIPOLAT, S., MARTINS DE BRITO, O., MICARONI, M., BEZNOUSSENKO, G. V., RUDKA, T., BARTOLI, D., POLISHUCK, R. S., DANIAL, N. N., DE STROOPER, B. i SCORRANO, L. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, 126(1):177–189.
- FRIEDMAN, J. R., LACKNER, L. L., WEST, M., DiBENEDETTO, J. R., NUNNARI, J. i VOELTZ, G. K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*, 334(6054):358–362.
- FUJIMOTO, M., HAYASHI, T. i SU, T. P. (2012). The role of cholesterol in the association of endoplasmic reticulum membranes with mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 417(1):635–639.
- FULLER, P. M., WARDEN, C. H., BARRY, S. J. i FULLER, C. A. (2000). Effects of 2-G exposure on temperature regulation, circadian rhythms, and adiposity in UCP2/3 transgenic mice. *J Appl Physiol*, 89(4):1491–1498.
- GALANTE, Y. M., WONG, S. Y. i HATEFI, Y. (1981). Resolution and reconstitution of complex V of the mitochondrial oxidative phosphorylation system: properties and composition of the membrane sector. *Arch Biochem Biophys*, 211(2):643–651.

- GARCIA, J. J., MORALES-RIOS, E., CORTES-HERNANDEZ, P. i RODRIGUEZ-ZAVALA, J. S. (2006). The inhibitor protein (IF₁) promotes dimerization of the mitochondrial F₁F_o-ATP synthase. *Biochemistry*, 45(42):12695–12703.
- GARLID, K. D., JABUREK, M. i JEZEK, P. (1998). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett*, 438(1-2):10–14.
- GAZARYAN, I. G. i BROWN, A. M. (2007). Intersection between mitochondrial permeability pores and mitochondrial fusion/fission. *Neurochem Res*, 32(4-5):917–929.
- GEGG, M. E., COOPER, J. M., CHAU, K. Y., ROJO, M., SCHAPIRA, A. H. i TAANMAN, J. W. (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK₁/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet*, 19(24):4861–4870.
- GEOLEN, A. i TRAYHURN, P. (1990). Regulation of the level of uncoupling protein in brown adipose tissue by insulin. *Am J Physiol*, 258(2 Pt 2):R418–24.
- GOGLIA, F., GEOLEN, A., LANNI, A., MINAIRE, Y. i BUKOWIECKI, L. J. (1992). Morphometric-stereologic analysis of brown adipocyte differentiation in adult mice. *Am J Physiol*, 262(4 Pt 1):C1018–23.
- GOGLIA, F. i SKULACHEV, V. P. (2003). A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J*, 17(12):1585–1591.
- GONG, D. W., HE, Y., KARAS, M. i REITMAN, M. (1997). Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta₃-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem*, 272(39):24129–24132.
- GONG, D. W., HE, Y. i REITMAN, M. L. (1999). Genomic organization and regulation by dietary fat of the uncoupling protein 3 and 2 genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 256(1):27–32.
- GONG, D. W., MONEMDJOU, S., GAVRILOVA, O., LEON, L. R., MARCUS-SAMUELS, B., CHOU, C. J., EVERETT, C., KOZAK, L. P., LI, C., DENG, C., HARPER, M. E. i REITMAN, M. L. (2000). Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem*, 275(21):16251–16257.
- GRECO-PEROTTO, R., ZANINETTI, D., ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F., BOBBIONI, E. i JEANRENAUD, B. (1987). Stimulatory effect of cold adaptation on glucose utilization by brown

- adipose tissue. Relationship with changes in the glucose transporter system. *J Biol Chem*, 262(16):7732–7736.
- GYULKHANDANYAN, A. V. i PENNEFATHER, P. S. (2004). Shift in the localization of sites of hydrogen peroxide production in brain mitochondria by mitochondrial stress. *J Neurochem*, 90(2):405–421.
- 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(2):269–297.
- HACKENBROCK, C. R. (1968). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J Cell Biol*, 37(2):345–369.
- HAEMMERLE, G., ZIMMERMANN, R., HAYN, M., THEUSSL, C., WAEG, G., WAGNER, E., SATTLER, W., MAGIN, T. M., WAGNER, E. F. i ZECHNER, R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem*, 277(7):4806–4815.
- HAJNOCZKY, G., ROBB-GASPERS, L. D., SEITZ, M. B. i THOMAS, A. P. (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, 82(3):415–424.
- HALL, J. C., SORDAHL, L. A. i STEFKO, P. L. (1960). The effect of insulin on oxidative phosphorylation in normal and diabetic mitochondria. *J Biol Chem*, 235:1536–1539.
- HAN, D., CANALI, R., RETTORI, D. i KAPLOWITZ, N. (2003). Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Mol Pharmacol*, 64(5):1136–1144.
- HAN, X. J., LU, Y. F., LI, S. A., KAITSUKA, T., SATO, Y., TOMIZAWA, K., NAIRN, A. C., TAKEI, K., MATSUI, H. i MATSUSHITA, M. (2008). CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol*, 182(3):573–585.
- HANSFORD, R. G., HOGUE, B. A. i MILDAZIENE, V. (1997). Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr*, 29(1):89–95.

- HARMS, M. i SEALE, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*, 19(10):1252–1263.
- HARROLD, J. A., WIDDOWSON, P. S., CLAPHAM, J. C. i WILLIAMS, G. (2000). Individual severity of dietary obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279(2):E340–7.
- HAVLICKOVA KARBANOVA, V., CIZKOVA VRBACKA, A., HEJZLAROVA, K., NUSKOVA, H., STRANECKY, V., POTOCKA, A., KMOCH, S. i HOUSTEK, J. (2012). Compensatory upregulation of respiratory chain complexes III and IV in isolated deficiency of ATP synthase due to TMEM70 mutation. *Biochim Biophys Acta*, 1817(7):1037–1043.
- HAYASHI, T., RIZZUTO, R., HAJNOCZKY, G. i SU, T. P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol*, 19(2):81–88.
- HAYATO, R., HIGURE, Y., KUBA, M., NAGAI, H., YAMASHITA, H. i KUBA, K. (2011). beta(3)-Adrenergic activation of sequential Ca(2+) release from mitochondria and the endoplasmic reticulum and the subsequent Ca(2+) entry in rodent brown adipocytes. *Cell Calcium*, 49(6):400–414.
- HE, Y. H., SONG, Y., LIAO, X. L., WANG, L., LI, G., ALIM, Y. i SUN, C. H. (2011). The calcium-sensing receptor affects fat accumulation via effects on antilipolytic pathways in adipose tissue of rats fed low-calcium diets. *J Nutr*, 141(11):1938–1946.
- HEATON, G. M., WAGENVOORD, R. J., KEMP JR., A. i NICHOLLS, D. G. (1978). Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem*, 82(2):515–521.
- HENLE, J. (1841). *Allgemeine Anatomie*. Verlag von Leopold Voss, Leipzig.
- HENRIKSEN, E. J. (2013). Effects of H₂O₂ on insulin signaling the glucose transport system in mammalian skeletal muscle. *Methods Enzymol*, 528:269–278.
- HIMMS-HAGEN, J. i 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*, 226(2):78–84.
- HIRST, J. (2013). Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem*, 82:551–575.

- HIRST, J., KING, M. S. i PRYDE, K. R. (2008). The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 5):976–980.
- HITTELMAN, K. J., FAIRHURST, A. S. i SMITH, R. E. (1967). Calcium accumulation as a parameter of energy metabolism in mitochondria of brown adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58(2):697–702.
- HOLM, C., FREDRIKSON, G., CANNON, B. i BELFRAGE, P. (1987). Hormone-sensitive lipase in brown adipose tissue: identification and effect of cold exposure. *Biosci Rep*, 7(11):897–904.
- HORVATH, B., SPIES, C., HORVATH, G., KOX, W. J., MIYAMOTO, S., BARRY, S., WARDEN, C. H., BECHMANN, I., DIANO, S., HEEMSKERK, J. i HORVATH, T. L. (2002). Uncoupling protein 2 (UCP2) lowers alcohol sensitivity and pain threshold. *Biochem Pharmacol*, 64(3):369–374.
- HORVATH, T. L., DIANO, S., MIYAMOTO, S., BARRY, S., GATTI, S., ALBERATI, D., LIVAK, F., LOMBARDI, A., MORENO, M., GOGLIA, F., MOR, G., HAMILTON, J., KACHINSKAS, D., HORWITZ, B. i WARDEN, C. H. (2003). Uncoupling proteins-2 and 3 influence obesity and inflammation in transgenic mice. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27(4):433–442.
- HOUSTEK, J. i DRAHOTA, Z. (1977). Purification and properties of mitochondrial adenosine triphosphatase of hamster brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*, 484(1):127–139.
- HOUSTEK, J., TVRDIK, P., PAVELKA, S. i BAUDYSOVA, M. (1991). Low content of mitochondrial ATPase in brown adipose tissue is the result of post-transcriptional regulation. *FEBS Lett*, 294(3):191–194.
- HSIEH, Y. C., YU, H. P., SUZUKI, T., CHOUDHRY, M. A., SCHWACHA, M. G., BLAND, K. I. i CHAUDRY, I. H. (2006). Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J Mol Cell Cardiol*, 41(3):511–521.
- HUROV, J. B., HUANG, M., WHITE, L. S., LENNERZ, J., CHOI, C. S., CHO, Y. R., KIM, H. J., PRIOR, J. L., PIWNICA-WORMS, D., CANTLEY, L. C., KIM, J. K., SHULMAN, G. I. i PIWNICA-WORMS, H. (2007). Loss of the Par-1b/MARK2 polarity kinase leads to increased metabolic rate, decreased adiposity, and insulin hypersensitivity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(13):5680–5685.

- INGERMAN, E., PERKINS, E. M., MARINO, M., MEARS, J. A., MCCAFFERY, J. M., HINSHAW, J. E. i NUNNARI, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol*, 170(7):1021–1027.
- INOKUMA, K., OGURA-OKAMATSU, Y., TODA, C., KIMURA, K., YAMASHITA, H. i SAITO, M. (2005). Uncoupling protein 1 is necessary for norepinephrine-induced glucose utilization in brown adipose tissue. *Diabetes*, 54(5):1385–1391.
- ISERI, O. A. i GOTTLIEB, L. S. (1971). Alcoholic hyalin and megamitochondria as separate and distinct entities in liver disease associated with alcoholism. *Gastroenterology*, 60(6):1027–1035.
- ISHIHARA, N., OTERA, H., OKA, T. i MIHARA, K. (2013). Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antioxid Redox Signal*, 19(4):389–399.
- JACOBSEN, R., LORENZEN, J. K., TOUBRO, S., KROG-MIKKELSEN, I. i ASTRUP, A. (2005). Effect of short-term high dietary calcium intake on 24-h energy expenditure, fat oxidation, and fecal fat excretion. *Int J Obes (Lond)*, 29(3):292–301.
- JASTROCH, M., HIRSCHBERG, V. i KLINGENSPOR, M. (2012). Functional characterization of UCP1 in mammalian HEK293 cells excludes mitochondrial uncoupling artefacts and reveals no contribution to basal proton leak. *Biochim Biophys Acta*, 1817(9):1660–1670.
- JEYARAJU, D. V., CISBANI, G. i PELLEGRINI, L. (2009). Calcium regulation of mitochondria motility and morphology. *Biochim Biophys Acta*, 1787(11):1363–1373.
- JEZEK, P. i GARLID, K. D. (1998). Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 30(11):1163–1168.
- JEZEK, P., JABUREK, M. i GARLID, K. D. (2010). Channel character of uncoupling protein-mediated transport. *FEBS Lett*, 584(10):2135–2141.
- JHENG, H. F., TSAI, P. J., GUO, S. M., KUO, L. H., CHANG, C. S., SU, I. J., CHANG, C. R. i TSAI, Y. S. (2012). Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol*, 32(2):309–319.
- JIANG, L., QIU, W., ZHOU, Y., WEN, P., FANG, L., CAO, H., ZEN, K., HE, W., ZHANG, C., DAI, C. i YANG, J. (2013). A microRNA-30e/mitochondrial uncoupling protein 2 axis mediates

- TGF- β 1-induced tubular epithelial cell extracellular matrix production and kidney fibrosis. *Kidney Int*, 84(2):285–296.
- JOSEPH, J. W., KOSHKIN, V., SALEH, M. C., SIVITZ, W. I., ZHANG, C. Y., LOWELL, B. B., CHAN, C. B. i WHEELER, M. B. (2004). Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. *J Biol Chem*, 279(49):51049–51056.
- JUNGALWALA, F. B. i DAWSON, R. M. (1970). Phospholipid synthesis and exchange in isolated liver cells. *Biochem J*, 117(3):481–490.
- KAGAWA, Y. i RACKER, E. (1966). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. X. Correlation of morphology and function in submitochondrial particles. *J Biol Chem*, 241(10):2475–2482.
- KAILA, V. R., VERKHOVSKY, M. I. i WIKSTROM, M. (2010). Proton-coupled electron transfer in cytochrome oxidase. *Chem Rev*, 110(12):7062–7081.
- KARBOWSKI, M., KURONO, C., WOZNIAK, M., OSTROWSKI, M., TERANISHI, M., NISHIZAWA, Y., USUKURA, J., SOJI, T. i WAKABAYASHI, T. (1999). Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 26(3-4):396–409.
- KELLEY, D. E., HE, J., MENSHIKOVA, E. V. i RITOV, V. B. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(10):2944–2950.
- KIRICHOK, Y., KRAPIVINSKY, G. i CLAPHAM, D. E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427(6972):360–364.
- KLEIN, J., FASSHAUER, M., ITO, M., LOWELL, B. B., BENITO, M. i KAHN, C. R. (1999). β (3)-adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes. *J Biol Chem*, 274(49):34795–34802.
- KLEIN, J., FASSHAUER, M., KLEIN, H. H., BENITO, M. i KAHN, C. R. (2002). Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *Bioessays*, 24(4):382–388.
- KLINGENBERG, M. (2010). Wanderings in bioenergetics and biomembranes. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7):579–594.

- KLINGENBERG, M. i HUANG, S. G. (1999). Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*, 1415(2):271–296.
- KLOTZSCH, E., SMORODCHENKO, A., LOFLER, L., MOLDZIO, R., PARKINSON, E., SCHUTZ, G. J. i POHL, E. E. (2015). Superresolution microscopy reveals spatial separation of UCP4 and FoF1-ATP synthase in neuronal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(1):130–135.
- KORAC, A., RADOVANOVIC, J., DAVIDOVIC, V., KOKO, V. i M., N. (1999). Apoptosis in the rat brown adipose tissue after insulin treatment. *J Therm Biol*, 24(5-6):461–464.
- KORNER, C., BARRERA, M., DUKANOVIC, J., EYDT, K., HARNER, M., RABL, R., VOGEL, F., RAPAPORT, D., NEUPERT, W. i REICHERT, A. S. (2012). The C-terminal domain of Fcjl is required for formation of crista junctions and interacts with the TOB/SAM complex in mitochondria. *Mol Biol Cell*, 23(11):2143–2155.
- KOVAROVA, N., CIZKOVA VRBACKA, A., PECINA, P., STRANECKY, V., PRONICKA, E., KMOCH, S. i HOUSTEK, J. (2012). Adaptation of respiratory chain biogenesis to cytochrome c oxidase deficiency caused by SURF1 gene mutations. *Biochim Biophys Acta*, 1822(7):1114–1124.
- KRAMAROVA, T. V., SHABALINA, I. G., ANDERSSON, U., WESTERBERG, R., CARLBERG, I., HOUSTEK, J., NEDERGAARD, J. i CANNON, B. (2008). Mitochondrial ATP synthase levels in brown adipose tissue are governed by the c-Fo subunit P1 isoform. *FASEB J*, 22(1):55–63.
- KRAUSS, S., ZHANG, C. Y. i LOWELL, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(3):248–261.
- KRAUSS, S., ZHANG, C. Y., SCORRANO, L., DALGAARD, L. T., ST-PIERRE, J., GREY, S. T. i LOWELL, B. B. (2003). Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest*, 112(12):1831–1842.
- KROOK, A., DIGBY, J., O'RAHILLY, S., ZIERATH, J. R. i WALLBERG-HENRIKSSON, H. (1998). Uncoupling protein 3 is reduced in skeletal muscle of NIDDM patients. *Diabetes*, 47(9):1528–1531.
- KUBLI, D. A. i GUSTAFSSON, A. B. (2012). Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res*, 111(9):1208–1221.

- KUDIN, A. P., BIMPONG-BUTA, N. Y., VIELHABER, S., ELGER, C. E. i KUNZ, W. S. (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem*, 279(6):4127–4135.
- KUZNETSOV, A. V. i MARGREITER, R. (2009). Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *Int J Mol Sci*, 10(4):1911–1929.
- LABROUSSE, A. M., ZAPPATERA, M. D., RUBE, D. A. i van der BLIEK, A. M. (1999). C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell*, 4(5):815–826.
- LAMBERT, A. J., BOYSEN, H. M., BUCKINGHAM, J. A., YANG, T., PODLUTSKY, A., AUSTAD, S. N., KUNZ, T. H., BUFFENSTEIN, R. i BRAND, M. D. (2007). Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell*, 6(5):607–618.
- LAPUENTE-BRUN, E., MORENO-LOSHUERTOS, R., ACIN-PEREZ, R., LATORRE-PELLICER, A., COLAS, C., Balsa, E., PERALES-CLEMENTE, E., QUIROS, P. M., CALVO, E., RODRIGUEZ-HERNANDEZ, M. A., NAVAS, P., CRUZ, R., CARRACEDO, A., LOPEZ-OTIN, C., PEREZ-MARTOS, A., FERNANDEZ-SILVA, P., FERNANDEZ-VIZARRA, E. i ENRIQUEZ, J. A. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*, 340(6140):1567–1570.
- LEAVER, E. V. i PAPPONE, P. A. (2002). Beta-adrenergic potentiation of endoplasmic reticulum Ca(2+) release in brown fat cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(5):C1016–24.
- LEBOUCHER, G. P., TSAI, Y. C., YANG, M., SHAW, K. C., ZHOU, M., VEENSTRA, T. D., GLICKMAN, M. H. i WEISSMAN, A. M. (2012). Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Mol Cell*, 47(4):547–557.
- LEE, S., TAK, E., LEE, J., RASHID, M. A., MURPHY, M. P., HA, J. i KIM, S. S. (2011). Mitochondrial H₂O₂ generated from electron transport chain complex I stimulates muscle differentiation. *Cell Res*, 21(5):817–834.
- LEE, S. C., NUCCITELLI, R. i PAPPONE, P. A. (1993). Adrenergically activated Ca²⁺ increases in brown fat cells: effects of Ca²⁺, K⁺, and K channel block. *Am J Physiol*, 264(1 Pt 1):C217–28.

- LEE, Y. J., JEONG, S. Y., KARBOWSKI, M., SMITH, C. L. i YOULE, R. J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*, 15(11):5001–5011.
- LEFEBVRE, V., DU, Q., BAIRD, S., NG, A. C., NASCIMENTO, M., CAMPANELLA, M., MCBRIDE, H. M. i SCREATOR, R. A. (2013). Genome-wide RNAi screen identifies ATPase inhibitory factor 1 (ATPIF1) as essential for PARK2 recruitment and mitophagy. *Autophagy*, 9(11):1770–1779.
- LEGESSE-MILLER, A., MASSOL, R. H. i KIRCHHAUSEN, T. (2003). Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*, 14(5):1953–1963.
- LENAZ, G., BARACCA, A., BARBERO, G., BERGAMINI, C., DALMONTE, M. E., DEL SOLE, M., FACCIOLI, M., FALASCA, A., FATO, R., GENOVA, M. L., SGARBI, G. i SOLAINI, G. (2010). Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7):633–640.
- LEWIS, M. R. i LEWIS, W. H. (1914). Mitochondria in Tissue Culture. *Science*, 39(1000):330–333.
- LI, X., FANG, P., MAI, J., CHOI, E. T., WANG, H. i YANG, X. F. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol*, 6:19.
- LIEBIG, M., von PRAUN, C., HELDMAIER, G. i KLINGENSPOR, M. (2004). Absence of UCP3 in brown adipose tissue does not impair nonshivering thermogenesis. *Physiol Biochem Zool*, 77(1):116–126.
- LINDBERG, O., de PIERRE, J., RYLANDER, E. i AFZELIUS, B. A. (1967). Studies of the mitochondrial energy-transfer system of brown adipose tissue. *J Cell Biol*, 34(1):293–310.
- LIU, H. Y., CAO, S. Y., HONG, T., HAN, J., LIU, Z. i CAO, W. (2009). Insulin is a stronger inducer of insulin resistance than hyperglycemia in mice with type 1 diabetes mellitus (T1DM). *J Biol Chem*, 284(40):27090–27100.
- LIU, Y., FISKUM, G. i SCHUBERT, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*, 80(5):780–787.

- LONG, Q., YANG, K. i YANG, Q. (2015). Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. *Am J Cardiovasc Dis*, 5(1):19–32.
- LORENZEN, J. K., NIELSEN, S., HOLST, J. J., TETENS, I., REHFELD, J. F. i ASTRUP, A. (2007). Effect of dairy calcium or supplementary calcium intake on postprandial fat metabolism, appetite, and subsequent energy intake. *Am J Clin Nutr*, 85(3):678–687.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. i RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1):265–275.
- MACLELLAN, J. D., GERRITS, M. F., GOWING, A., SMITH, P. J., WHEELER, M. B. i HARPER, M. E. (2005). Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. *Diabetes*, 54(8):2343–2350.
- MAHADEV, K., ZILBERING, A., ZHU, L. i GOLDSTEIN, B. J. (2001). Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem*, 276(24):21938–21942.
- MAKLASHINA, E. i CECCHINI, G. (2010). The quinone-binding and catalytic site of complex II. *Biochim Biophys Acta*, 1797(12):1877–1882.
- MALKA, F., GUILLERY, O., CIFUENTES-DIAZ, C., GUILLOU, E., BELENGUER, P., LOMBES, A. i ROJO, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep*, 6(9):853–859.
- MANNELLA, C. A. (2008). Structural diversity of mitochondria: functional implications. *Ann N Y Acad Sci*, 1147:171–179.
- MANNELLA, C. A., MARKO, M., PENCZEK, P., BARNARD, D. i FRANK, J. (1994). The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech*, 27(4):278–283.
- MARETTE, A., DESHAIES, Y., COLLET, A. J., TULP, O. i BUKOWIECKI, L. J. (1991a). Major thermogenic defect associated with insulin resistance in brown adipose tissue of obese diabetic SHR/N-cp rats. *Am J Physiol*, 261(2 Pt 1):E204–13.

- MARETTE, A., TULP, O. L. i BUKOWIECKI, L. J. (1991b). Mechanism linking insulin resistance to defective thermogenesis in brown adipose tissue of obese diabetic SHR/N-cp rats. *Int J Obes*, 15(12):823–831.
- MARKELIC, M., VELICKOVIC, K., GOLIC, I., KLEPAL, W., OTASEVIC, V., STANCIC, A., JANKOVIC, A., VUCETIC, M., BUZADZIC, B., KORAC, B. i KORAC, A. (2013). The origin of lipofuscin in brown adipocytes of hyperinsulinaemic rats: the role of lipid peroxidation and iron. *Histol Histopathol*, 28(4):493–503.
- MAROTTE, C., BRYK, G., GONZALES CHAVES, M. M., LIFSHITZ, F., de PORTELA, M. L. i ZENI, S. N. (2014). Low dietary calcium and obesity: a comparative study in genetically obese and normal rats during early growth. *Eur J Nutr*, 53(3):769–778.
- MARSBOOM, G., TOTH, P. T., RYAN, J. J., HONG, Z., WU, X., FANG, Y. H., THENAPPAN, T., PIAO, L., ZHANG, H. J., POGORILER, J., CHEN, Y., MORROW, E., WEIR, E. K., REHMAN, J. i ARCHER, S. L. (2012). Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension. *Circ Res*, 110(11):1484–1497.
- MARTIN, S. D., MORRISON, S., KONSTANTOPOULOS, N. i MCGEE, S. L. (2014). Mitochondrial dysfunction has divergent, cell type-dependent effects on insulin action. *Mol Metab*, 3(4):408–418.
- MATSUO, K., BETTAIEB, A., NAGATA, N., MATSUO, I., KEILHACK, H. i HAJ, F. G. (2011). Regulation of brown fat adipogenesis by protein tyrosine phosphatase 1B. *PLoS One*, 6(1): e16446.
- MATTHIAS, A., OHLSON, K. B., FREDRIKSSON, J. M., JACOBSSON, A., NEDERGAARD, J. i CANNON, B. (2000). Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *J Biol Chem*, 275(33):25073–25081.
- MATTIASSON, G. i SULLIVAN, P. G. (2006). The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxid Redox Signal*, 8(1-2):1–38.
- MAY, J. M. i de HAEN, C. (1979). Insulin-stimulated intracellular hydrogen peroxide production in rat epididymal fat cells. *J Biol Chem*, 254(7):2214–2220.

- MEARS, J. A., LACKNER, L. L., FANG, S., INGERMAN, E., NUNNARI, J. i HINSHAW, J. E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol*, 18(1):20–26.
- MEEUSEN, S., DEVAY, R., BLOCK, J., CASSIDY-STONE, A., WAYSON, S., MCCAFFERY, J. M. i NUNNARI, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell*, 127(2):383–395.
- MEEUSEN, S., MCCAFFERY, J. M. i NUNNARI, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*, 305(5691):1747–1752.
- MENZ, R. I., WALKER, J. E. i LESLIE, A. G. (2001). Structure of bovine mitochondrial F₁-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. *Cell*, 106(3):331–341.
- MITCHELL, P. (1979). Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science*, 206(4423):1148–1159.
- MITCHELL, P. (2011). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966. *Biochim Biophys Acta*, 1807(12):1507–1538.
- MONTGOMERY, M. K. i TURNER, N. (2015). Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocr Connect*, 4(1):R1–R15.
- MOOTHA, V. K., LINDGREN, C. M., ERIKSSON, K. F., SUBRAMANIAN, A., SIHAG, S., LEHAR, J., PUIGSERVER, P., CARLSSON, E., RIDDERSTRALE, M., LAURILA, E., HOUSTIS, N., DALY, M. J., PATTERSON, N., MESIROV, J. P., GOLUB, T. R., TAMAYO, P., SPIEGELMAN, B., LANDER, E. S., HIRSCHHORN, J. N., ALTSHULER, D. i GROOP, L. C. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*, 34(3):267–273.
- MOTZ, C., HORNING, T., KERSTEN, M., MCLACHLIN, D. T., DUNN, S. D., WISE, J. G. i VOGEL, P. D. (2004). The subunit b dimer of the FOF₁-ATP synthase: interaction with F₁-ATPase as deduced by site-specific spin-labeling. *J Biol Chem*, 279(47):49074–49081.
- MUR, C., ARRIBAS, M., BENITO, M. i VALVERDE, A. M. (2003). Essential role of insulin-like growth factor I receptor in insulin-induced fetal brown adipocyte differentiation. *Endocrinology*, 144(2):581–593.

- MURPHY, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417(1): 1–13.
- MURRAY, A. J., ANDERSON, R. E., WATSON, G. C., RADDA, G. K. i CLARKE, K. (2004). Uncoupling proteins in human heart. *Lancet*, 364(9447):1786–1788.
- MUSTER, B., KOHL, W., WITTIG, I., STRECKER, V., JOOS, F., HAASE, W., BEREITER-HAHN, J. i BUSCH, K. (2010). Respiratory chain complexes in dynamic mitochondria display a patchy distribution in life cells. *PLoS One*, 5(7):e11910.
- MUZZIN, P., REVELLI, J. P., KUHNE, F., GOCAYNE, J. D., MCCOMBIE, W. R., VENTER, J. C., GIACOBINO, J. P. i FRASER, C. M. (1991). An adipose tissue-specific beta-adrenergic receptor. Molecular cloning and down-regulation in obesity. *J Biol Chem*, 266(35):24053–24058.
- NAKADA, K., INOUE, K., ONO, T., ISOBE, K., OGIURA, A., GOTO, Y. I., NONAKA, I. i HAYASHI, J. I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med*, 7(8):934–940.
- NAKAGAKI, I., SASAKI, S., YAHATA, T., TAKASAKI, H. i HORI, S. (2005). Cytoplasmic and mitochondrial Ca levels in brown adipocytes. *Acta Physiol Scand*, 183(1):89–97.
- NAKAMURA, J., FUJIKAWA, M. i YOSHIDA, M. (2013). IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. *Biosci Rep*, 33(5): 735–741.
- NEDERGAARD, J., BENGTTSSON, T. i CANNON, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(2):E444–52.
- NICASTRO, D., FRANGAKIS, A. S., TYPKE, D. i BAUMEISTER, W. (2000). Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria. *J Struct Biol*, 129(1):48–56.
- NICHOLLS, D. G. (1974). The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur J Biochem*, 50(1):305–315.
- NICHOLLS, D. G. (2006). The physiological regulation of uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1757(5-6):459–466.
- NICHOLLS, D. G. i FERGUSON, S. (2013). *Bioenergetics*. Academic Press, London, 4. izdanje.

- NICHOLLS, D. G. i LOCKE, R. M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*, 64(1):1–64.
- NISR, R. B. i AFFOURTIT, C. (2014). Insulin acutely improves mitochondrial function of rat and human skeletal muscle by increasing coupling efficiency of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1837(2):270–276.
- NOBRE, J. L., LISBOA, P. C., SANTOS-SILVA, A. P., LIMA, N. S., MANHAES, A. C., NOGUEIRA-NETO, J. F., CABANELAS, A., PAZOS-MOURA, C. C., MOURA, E. G. i de OLIVEIRA, E. (2011). Calcium supplementation reverts central adiposity, leptin, and insulin resistance in adult offspring programmed by neonatal nicotine exposure. *J Endocrinol*, 210(3):349–359.
- OGAWA, K., SAITO, T. i MAYAHARA, H. (1968). The site of ferricyanide reduction by reductases within mitochondria as studied by electron microscopy. *J Histochem Cytochem*, 16(1):49–57.
- OKUNO, D., IINO, R. i NOJI, H. (2011). Rotation and structure of FoF₁-ATP synthase. *J Biochem*, 149(6):655–664.
- OMATSU-KANBE, M. i KITASATO, H. (1992). Insulin and noradrenaline independently stimulate the translocation of glucose transporters from intracellular stores to the plasma membrane in mouse brown adipocytes. *FEBS Lett*, 314(3):246–250.
- OMATSU-KANBE, M., ZARNOWSKI, M. J. i CUSHMAN, S. W. (1996). Hormonal regulation of glucose transport in a brown adipose cell preparation isolated from rats that shows a large response to insulin. *Biochem J*, 315 (Pt 1):25–31.
- ONO, S., SONE, N., YOSHIDA, M. i SUZUKI, T. (2004). ATP synthase that lacks F_oa-subunit: isolation, properties, and indication of F_ob₂-subunits as an anchor rail of a rotating c-ring. *J Biol Chem*, 279(32):33409–33412.
- ONO, T., ISOBE, K., NAKADA, K. i HAYASHI, J. I. (2001). Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet*, 28(3):272–275.
- ORAVA, J., NUUTILA, P., LIDELL, M. E., OIKONEN, V., NOPONEN, T., VILJANEN, T., SCHEININ, M., TAITTONEN, M., NIEMI, T., ENERBACK, S. i VIRTANEN, K. A. (2011). Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab*, 14(2): 272–279.

- OSMAN, C., VOELKER, D. R. i LANGER, T. (2011). Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol*, 192(1):7–16.
- OTERA, H., WANG, C., CLELAND, M. M., SETOGUCHI, K., YOKOTA, S., YOULE, R. J. i MIHARA, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*, 191(6):1141–1158.
- PALADE, G. E. (1952). The fine structure of mitochondria. *Anat Rec*, 114(3):427–451.
- PALADE, G. E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*, 1(4):188–211.
- PARIKH, S. J. i YANOVSKI, J. A. (2003). Calcium intake and adiposity. *Am J Clin Nutr*, 77(2):281–287.
- PARRA, V., VERDEJO, H. E., IGLEWSKI, M., DEL CAMPO, A., TRONCOSO, R., JONES, D., ZHU, Y., KUZMICIC, J., PENNANEN, C., LOPEZ-CRISOSTO, C., JANA, F., FERREIRA, J., NOGUERA, E., CHIONG, M., BERNLOHR, D. A., KLIP, A., HILL, J. A., ROTHERMEL, B. A., ABEL, E. D., ZORZANO, A. i LAVANDERO, S. (2014). Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NFkappaB-Opa-1 signaling pathway. *Diabetes*, 63(1):75–88.
- PATERGNANI, S., SUSKI, J. M., AGNOLETTI, C., BONONI, A., BONORA, M., DE MARCHI, E., GIORGI, C., MARCHI, S., MISSIROLI, S., POLETTI, F., RIMESSI, A., DUSZYNSKI, J., WIECKOWSKI, M. R. i PINTON, P. (2011). Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal*, 9:19.
- PAUMARD, P., VAILLIER, J., COULARY, B., SCHAEFFER, J., SOUBANNIER, V., MUELLER, D. M., BRETHES, D., di RAGO, J. P. i VELOURS, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J*, 21(3):221–230.
- PERKINS, G., RENKEN, C., MARTONE, M. E., YOUNG, S. J., ELLISMAN, M. i FREY, T. (1997). Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol*, 119(3):260–272.
- PERKINS, G. A., ELLISMAN, M. H. i FOX, D. A. (2003). Three-dimensional analysis of mouse rod and cone mitochondrial cristae architecture: bioenergetic and functional implications. *Mol Vis*, 9:60–73.

- PERKINS, G. A., SONG, J. Y., TARSA, L., DEERINCK, T. J., ELLISMAN, M. H. i FREY, T. G. (1998). Electron tomography of mitochondria from brown adipocytes reveals crista junctions. *J Bioenerg Biomembr*, 30(5):431–442.
- PERSIYANTSEVA, N. A., STOROZHEVYKH, T. P., SENILOVA, Y. E., GORBACHEVA, L. R., PINELIS, V. G. i POMYTKIN, I. A. (2013). Mitochondrial H₂O₂ as an enable signal for triggering autophosphorylation of insulin receptor in neurons. *J Mol Signal*, 8(1):11.
- PESTA, D. i GNAIGER, E. (2012). High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol*, 810:25–58.
- PETERSEN, K. F., DUFOUR, S. i SHULMAN, G. I. (2005). Decreased insulin-stimulated ATP synthesis and phosphate transport in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *PLoS Med*, 2(9):e233.
- PETERSEN, P. (1977). Abnormal mitochondria in hepatocytes in human fatty liver. *Acta Pathol Microbiol Scand A*, 85(3):413–420.
- PETROVIC, V., KORAC, A., BUZADZIC, B., VASILJEVIC, A., JANKOVIC, A., MICUNOVIC, K. i KORAC, B. (2008). Nitric oxide regulates mitochondrial re-modelling in interscapular brown adipose tissue: ultrastructural and morphometric-stereologic studies. *J Microsc*, 232(3):542–548.
- PI, J., BAI, Y., ZHANG, Q., WONG, V., FLOERING, L. M., DANIEL, K., REECE, J. M., DEENEY, J. T., ANDERSEN, M. E., CORKEY, B. E. i COLLINS, S. (2007). Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, 56(7):1783–1791.
- POGORYELOV, D., YU, J., MEIER, T., VONCK, J., DIMROTH, P. i MULLER, D. J. (2005). The c15 ring of the *Spirulina platensis* F-ATP synthase: F₁/F_o symmetry mismatch is not obligatory. *EMBO Rep*, 6(11):1040–1044.
- POOLE, A. C., THOMAS, R. E., YU, S., VINCOW, E. S. i PALLANCK, L. (2010). The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK₁/parkin pathway. *PLoS One*, 5(4):e10054.
- PORRAS, A., ALVAREZ, A. M., VALLADARES, A. i BENITO, M. (1998). p42/p44 mitogen-activated protein kinases activation is required for the insulin-like growth factor-I/insulin induced

- proliferation, but inhibits differentiation, in rat fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol*, 12(6): 825–834.
- POZZAN, T., DI VIRGILIO, F., VICENTINI, L. M. i MELDOLESI, J. (1986). Activation of muscarinic receptors in PC12 cells. Stimulation of Ca²⁺ influx and redistribution. *Biochem J*, 234(3):547–553.
- PRIETO, I., JIMENEZ, F., ALLER, M. A., NAVA, M. P., VARA, E., GARCIA, C. i ARIAS, J. (2005). Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and nitric oxide: induction of liver megamitochondria in prehepatic portal hypertensive rats. *World J Surg*, 29(7):903–908.
- PUTNEY JR., J. W. (2003). Capacitative calcium entry in the nervous system. *Cell Calcium*, 34(4–5):339–344.
- QIU, W., ZHOU, Y., JIANG, L., FANG, L., CHEN, L., SU, W., TAN, R., ZHANG, C. Y., HAN, X. i YANG, J. (2012). Genipin inhibits mitochondrial uncoupling protein 2 expression and ameliorates podocyte injury in diabetic mice. *PLoS One*, 7(7):e41391.
- QUINLAN, C. L., ORR, A. L., PEREVOSHCHIKOVA, I. V., TREBERG, J. R., ACKRELL, B. A. i BRAND, M. D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem*, 287(32):27255–27264.
- RABL, R., SOUBANNIER, V., SCHOLZ, R., VOGEL, F., MENDEL, N., VASILJEV-NEUMEYER, A., KORNER, C., JAGASIA, R., KEIL, T., BAUMEISTER, W., CYRKLAFF, M., NEUPERT, W. i REICHERT, A. S. (2009). Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fc1 and Su e/g. *J Cell Biol*, 185(6):1047–1063.
- RIAL, E. i GONZALEZ-BARROSO, M. M. (2001). Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim Biophys Acta*, 1504(1):70–81.
- RIPPE, C., BERGER, K., BOIERS, C., RICQUIER, D. i ERLANSON-ALBERTSSON, C. (2000). Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279(2):E293–300.
- RODRIGUEZ, V. M., PORTILLO, M. P., PICO, C., MACARULLA, M. T. i PALOU, A. (2002). Olive oil feeding up-regulates uncoupling protein genes in rat brown adipose tissue and skeletal muscle. *Am J Clin Nutr*, 75(2):213–220.

- ROJO, M., LEGROS, F., CHATEAU, D. i LOMBES, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*, 115(Pt 8):1663–1674.
- ROSCA, M. G., VAZQUEZ, E. J., CHEN, Q., KERNER, J., KERN, T. S. i HOPPEL, C. L. (2012). Oxidation of fatty acids is the source of increased mitochondrial reactive oxygen species production in kidney cortical tubules in early diabetes. *Diabetes*, 61(8):2074–2083.
- ROTHWELL, N. J. i STOCK, M. J. (1981). A role for insulin in the diet-induced thermogenesis of cafeteria-fed rats. *Metabolism*, 30(7):673–678.
- ROTHWELL, N. J., STOCK, M. J. i WYLLIE, M. G. (1981). Sympathetic mechanisms in diet-induced thermogenesis: modification by ciclazindol and anorectic drugs. *Br J Pharmacol*, 74(3):539–546.
- ROTTENBERG, H. i SCARPA, A. (1974). Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. *Biochemistry*, 13(23):4811–4817.
- RYAN, J. J., MARSBOOM, G., FANG, Y. H., TOTH, P. T., MORROW, E., LUO, N., PIAO, L., HONG, Z., ERICSON, K., ZHANG, H. J., HAN, M., HANEY, C. R., CHEN, C. T., SHARP, W. W. i ARCHER, S. L. (2013). PGC1 α -mediated mitofusin-2 deficiency in female rats and humans with pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 187(8):865–878.
- SALABEI, J. K. i HILL, B. G. (2013). Mitochondrial fission induced by platelet-derived growth factor regulates vascular smooth muscle cell bioenergetics and cell proliferation. *Redox Biol*, 1:542–551.
- SAMEC, S., SEYDOUX, J. i DULLOO, A. G. (1998). Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? *FASEB J*, 12(9):715–724.
- SANCHEZ-CENIZO, L., FORMENTINI, L., ALDEA, M., ORTEGA, A. D., GARCIA-HUERTA, P., SANCHEZ-ARAGO, M. i CUEZVA, J. M. (2010). Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J Biol Chem*, 285(33):25308–25313.
- SANTEL, A., FRANK, S., GAUME, B., HERRLER, M., YOULE, R. J. i FULLER, M. T. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci*, 116(Pt 13):2763–2774.

- SARASTE, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*, 283(5407):1488–1493.
- SCHAGGER, H., BRANDT, U., GENCIC, S. i von JAGOW, G. (1995). Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria. *Methods Enzymol*, 260:82–96.
- SCHAGGER, H., LINK, T. A., ENGEL, W. D. i von JAGOW, G. (1986). Isolation of the eleven protein subunits of the bc₁ complex from beef heart. *Methods Enzymol*, 126:224–237.
- SCHAGGER, H. i PFEIFFER, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*, 19(8):1777–1783.
- SCHIFFLER, I. E. (2008). *Mitochondria*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2. izdanje.
- SCHON, E. A. i AREA-GOMEZ, E. (2013). Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *Mol Cell Neurosci*, 55:26–36.
- SCHONFELD, P. i WOJTCZAK, L. (2012). Brown adipose tissue mitochondria oxidizing fatty acids generate high levels of reactive oxygen species irrespective of the uncoupling protein-1 activity state. *Biochim Biophys Acta*, 1817(3):410–418.
- SCHRAGER, S. (2005). Dietary calcium intake and obesity. *J Am Board Fam Pract*, 18(3):205–210.
- SCHRAUWEN, P. i HESSELINK, M. K. (2004). The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? *Proc Nutr Soc*, 63(2):287–292.
- SCHRAUWEN, P., HOEKS, J., SCHAART, G., KORNIPS, E., BINAS, B., VAN DE VUSSE, G. J., VAN BILSEN, M., LUIKEN, J. J., COORT, S. L., GLATZ, J. F., SARIS, W. H. i HESSELINK, M. K. (2003). Uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter. *FASEB J*, 17(15):2272–2274.
- SCHRAUWEN, P., TROOST, F. J., XIA, J., RAVUSSIN, E. i SARIS, W. H. (1999). Skeletal muscle UCP2 and UCP3 expression in trained and untrained male subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23(9):966–972.
- SCHWERZMANN, K. i PEDERSEN, P. L. (1986). Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. *Arch Biochem Biophys*, 250(1):1–18.

- SCORRANO, L., ASHIYA, M., BUTTLE, K., WEILER, S., OAKES, S. A., MANNELLA, C. A. i KORSMEYER, S. J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*, 2(1):55–67.
- SEARS, D. A., FRIEDMAN, J. M. i WHITE, D. R. (1975). Binding of intracellular protein to the erythrocyte membrane during incubation: the production of heinz bodies. *J Lab Clin Med*, 86:722–732.
- SHABALINA, I. G., JACOBSSON, A., CANNON, B. i NEDERGAARD, J. (2004). Native UCP₁ displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids. *J Biol Chem*, 279(37):38236–38248.
- SHABALINA, I. G., OST, M., PETROVIC, N., VRBACKY, M., NEDERGAARD, J. i CANNON, B. (2010). Uncoupling protein-1 is not leaky. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7):773–784.
- SHACKNEY, S. E. i JOEL, C. D. (1966). Stimulation of glucose metabolism in brown adipose tissue by addition of insulin in vitro. *J Biol Chem*, 241(17):4004–4010.
- SHIH, M. F. i TABERNER, P. V. (1995). Selective activation of brown adipocyte hormone-sensitive lipase and cAMP production in the mouse by beta 3-adrenoceptor agonists. *Biochem Pharmacol*, 50(5):601–608.
- SHISHIDO, S., KOGA, H., HARADA, M., KUMEMURA, H., HANADA, S., TANIGUCHI, E., KUMASHIRO, R., OHIRA, H., SATO, Y., NAMBA, M., UENO, T. i SATA, M. (2003). Hydrogen peroxide overproduction in megamitochondria of troglitazone-treated human hepatocytes. *Hepatology*, 37(1):136–147.
- SILVA, A. M. i OLIVEIRA, P. J. (2012). Evaluation of respiration with clark type electrode in isolated mitochondria and permeabilized animal cells. *Methods Mol Biol*, 810:7–24.
- SILVA, J. E. i RABELO, R. (1997). Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol*, 136(3):251–264.
- SIMONEAU, J. A., KELLEY, D. E., NEVEROVA, M. i WARDEN, C. H. (1998). Overexpression of muscle uncoupling protein 2 content in human obesity associates with reduced skeletal muscle lipid utilization. *FASEB J*, 12(15):1739–1745.
- SJOSTRAND, F. S. (1953a). Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature*, 171(4340):30–32.

- SJOSTRAND, F. S. (1953b). The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope. *J Cell Physiol*, 42(1):15–44.
- SKULACHEV, V. P. (1990). Power transmission along biological membranes. *J Membr Biol*, 114(2):97–112.
- SLOT, J. W., GEUZE, H. J., GIGENGACK, S., LIENHARD, G. E. i JAMES, D. E. (1991). Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol*, 113(1):123–135.
- SMITH, R. A. i ORD, M. J. (1983). Mitochondrial form and function relationships in vivo: their potential in toxicology and pathology. *Int Rev Cytol*, 83:63–134.
- SONG, Z., CHEN, H., FIKET, M., ALEXANDER, C. i CHAN, D. C. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol*, 178(5):749–755.
- SOUZA, S. C., CHRISTOFFOLETE, M. A., RIBEIRO, M. O., MIYOSHI, H., STRISSEL, K. J., STANCHEVA, Z. S., ROGERS, N. H., D'EON, T. M., PERFIELD 2ND, J. W., IMACHI, H., OBIN, M. S., BIANCO, A. C. i GREENBERG, A. S. (2007). Perilipin regulates the thermogenic actions of norepinephrine in brown adipose tissue. *J Lipid Res*, 48(6):1273–1279.
- SPEIJER, D. (2011). Oxygen radicals shaping evolution: why fatty acid catabolism leads to peroxisomes while neurons do without it: FADH(2)/NADH flux ratios determining mitochondrial radical formation were crucial for the eukaryotic invention of peroxisomes and catabolic tissue differentiation. *Bioessays*, 33(2):88–94.
- STANFORD, K. I., MIDDELBEEK, R. J., TOWNSEND, K. L., AN, D., NYGAARD, E. B., HITCHCOX, K. M., MARKAN, K. R., NAKANO, K., HIRSHMAN, M. F., TSENG, Y. H. i GOODYEAR, L. J. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest*, 123(1):215–223.
- STOCK, D., LESLIE, A. G. i WALKER, J. E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 286(5445):1700–1705.
- STOROZHEVYKH, T. P., SENILOVA, Y. E., PERSIYANTSEVA, N. A., PINELIS, V. G. i POMYTKIN, I. A. (2007). Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide

- production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. *BMC Neurosci*, 8:84.
- STRAUSS, M., HOFHAUS, G., SCHRODER, R. R. i KUHLBRANDT, W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J*, 27(7):1154–1160.
- STROH, A., ANDERKA, O., PFEIFFER, K., YAGI, T., FINEL, M., LUDWIG, B. i SCHAGGER, H. (2004). Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem*, 279(6):5000–5007.
- STUMP, C. S., SHORT, K. R., BIGELOW, M. L., SCHIMKE, J. M. i NAIR, K. S. (2003). Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13):7996–8001.
- SUN, C. N., DHALLA, N. S. i OLSON, R. E. (1969). Formation of gigantic mitochondria in hypoxic isolated perfused rat hearts. *Experientia*, 25(7):763–764.
- SUN, F., HUO, X., ZHAI, Y., WANG, A., XU, J., SU, D., BARTLAM, M. i RAO, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7):1043–1057.
- SUN, M. G., WILLIAMS, J., MUNOZ-PINEDO, C., PERKINS, G. A., BROWN, J. M., ELLISMAN, M. H., GREEN, D. R. i FREY, T. G. (2007). Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat Cell Biol*, 9(9):1057–1065.
- SUN, X. i ZEMEL, M. B. (2004). Calcium and dairy products inhibit weight and fat regain during ad libitum consumption following energy restriction in Ap2-agouti transgenic mice. *J Nutr*, 134(11):3054–3060.
- SUZUKI, T., UENO, H., MITOME, N., SUZUKI, J. i YOSHIDA, M. (2002). F(o) of ATP synthase is a rotary proton channel. Obligatory coupling of proton translocation with rotation of c-subunit ring. *J Biol Chem*, 277(15):13281–13285.
- SZABADKAI, G., SIMONI, A. M., CHAMI, M., WIECKOWSKI, M. R., YOULE, R. J. i RIZZUTO, R. (2004). Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis. *Mol Cell*, 16(1):59–68.

- TAGUCHI, N., ISHIHARA, N., JOFUKU, A., OKA, T. i MIHARA, K. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem*, 282(15): 11521–11529.
- TANAKA, A., CLELAND, M. M., XU, S., NARENDRA, D. P., SUEN, D. F., KARBOWSKI, M. i YOULE, R. J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol*, 191(7):1367–1380.
- TEEGARDEN, D. (2003). Calcium intake and reduction in weight or fat mass. *J Nutr*, 133(1): 249S–251S.
- TERUEL, T., VALVERDE, A. M., BENITO, M. i LORENZO, M. (1996). Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem J*, 319 (Pt 2):627–632.
- TSUKIHARA, T., AOYAMA, H., YAMASHITA, E., TOMIZAKI, T., YAMAGUCHI, H., SHINZAWA-ITOH, K., NAKASHIMA, R., YAONO, R. i YOSHIKAWA, S. (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 269(5227):1069–1074.
- TSUKIHARA, T., AOYAMA, H., YAMASHITA, E., TOMIZAKI, T., YAMAGUCHI, H., SHINZAWA-ITOH, K., NAKASHIMA, R., YAONO, R. i YOSHIKAWA, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272(5265):1136–1144.
- TUCHIYA, K. i NAGAI, M. (1994). Increase in intracellular calcium in freshly-dispersed, single brown adipocytes of the rat by adrenergic stimulation. *Biomed Res*, 15(5):347–355.
- TUROVSKII, E. A., KONAKOV, M. V., BEREZHNOV, A. V., ZINCHENKO, V. P., BRONNIKOV, G. E. i DOLGACHEVA, L. P. (2011). Change in Ca²⁺-responses of cultivated brown adipocytes at adrenergic activation. *Cell Tissue Biol*, 5(5):511–519.
- TWIG, G., ELORZA, A., MOLINA, A. J., MOHAMED, H., WIKSTROM, J. D., WALZER, G., STILES, L., HAIGH, S. E., KATZ, S., LAS, G., ALROY, J., WU, M., PY, B. F., YUAN, J., DEENEY, J. T., CORKEY, B. E. i SHIRIHAI, O. S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*, 27(2):433–446.
- VALVERDE, A. M., ARRIBAS, M., MUR, C., NAVARRO, P., PONS, S., CASSARD-DOULCIER, A. M., KAHN, C. R. i BENITO, M. (2003). Insulin-induced up-regulated uncoupling protein-1

- expression is mediated by insulin receptor substrate 1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in fetal brown adipocytes. *J Biol Chem*, 278(12):10221–10231.
- VALVERDE, A. M., LORENZO, M., PONS, S., WHITE, M. F. i BENITO, M. (1998a). Insulin receptor substrate (IRS) proteins IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/insulin-like growth factor-I pathways in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol*, 12(5):688–697.
- VALVERDE, A. M., NAVARRO, P., BENITO, M. i LORENZO, M. (1998b). H-ras induces glucose uptake in brown adipocytes in an insulin- and phosphatidylinositol 3-kinase-independent manner. *Exp Cell Res*, 243(2):274–281.
- VAN GAAL, L. F., MERTENS, I. L. i DE BLOCK, C. E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444(7121):875–880.
- VASINGTON, F. D. i MURPHY, J. V. (1962). Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *J Biol Chem*, 237:2670–2677.
- VETTOR, R., FABRIS, R., SERRA, R., LOMBARDI, A. M., TONELLO, C., GRANZOTTO, M., MARZOLO, M. O., CARRUBA, M. O., RICQUIER, D., FEDERSPIL, G. i NISOLI, E. (2002). Changes in FAT/CD36, UCP2, UCP3 and GLUT4 gene expression during lipid infusion in rat skeletal and heart muscle. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26(6):838–847.
- VIDAL-PUIG, A., SOLANES, G., GRUJIC, D., FLIER, J. S. i LOWELL, B. B. (1997). UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 235(1):79–82.
- VIDAL-PUIG, A. J., GRUJIC, D., ZHANG, C. Y., HAGEN, T., BOSS, O., IDO, Y., SZCZEPANIK, A., WADE, J., MOOTHA, V., CORTRIGHT, R., MUOIO, D. M. i LOWELL, B. B. (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem*, 275(21):16258–16266.
- VOET, D. i VOET, J. G. (2004). *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 4. izdanje.
- VOGEL, F., BORNHOVD, C., NEUPERT, W. i REICHERT, A. S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*, 175(2):237–247.
- WAKABAYASHI, T., ADACHI, K., MATSUHASHI, T., WOZNIAK, M., ANTOSIEWICZ, J. i KARBOWSKY, M. (1997). Suppression of the formation of megamitochondria by scavengers for free radicals. *Mol Aspects Med*, 18 Suppl:S51–61.

- WAKABAYASHI, T., HORIUCHI, M., SAKAGUCHI, M., MISAWA, K., ONDA, H., IJIMA, M. i ALLMANN, D. W. (1984). Mechanism of hepatic megamitochondria formation by ammonia derivatives. Correlation between structure of chemicals and their ability to induce the formation of megamitochondria. *Eur J Biochem*, 143(2):455–465.
- WALKER, J. E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans*, 41(1):1–16.
- WALTER, L. i HAJNOCZKY, G. (2005). Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk. *J Bioenerg Biomembr*, 37(3):191–206.
- WANG, H., SONG, P., DU, L., TIAN, W., YUE, W., LIU, M., LI, D., WANG, B., ZHU, Y., CAO, C., ZHOU, J. i CHEN, Q. (2011). Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *J Biol Chem*, 286(13):11649–11658.
- WANG, Y., HUANG, L., ABDELRAHIM, M., CAI, Q., TRUONG, A., BICK, R., POINDEXTER, B. i SHEIKH-HAMAD, D. (2009). Stanniocalcin-1 suppresses superoxide generation in macrophages through induction of mitochondrial UCP2. *J Leukoc Biol*, 86(4):981–988.
- WATSON, R. T. i PESSIN, J. E. (2001). Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp Cell Res*, 271(1):75–83.
- WATT, I. N., MONTGOMERY, M. G., RUNSWICK, M. J., LESLIE, A. G. i WALKER, J. E. (2010). Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(39):16823–16827.
- WAUGH, S. M. i LOW, P. S. (1985). Hemichrome binding to band 3: nucleation of heinz bodies on the erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 24(1):34–39.
- WEBER, J. i SENIOR, A. E. (2000). ATP synthase: what we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1458(2-3):300–309.
- WEI, L., HUBBARD, S. R., HENDRICKSON, W. A. i ELLIS, L. (1995). Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain. *J Biol Chem*, 270(14):8122–8130.

- WEIBEL, E. R., STAUBLI, W., GNAGI, H. R. i HESS, F. A. (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol*, 42(1):68–91.
- WESTERMANN, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(12):872–884.
- WESTERMANN, B. (2012). Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta*, 1817(10):1833–1838.
- WHITE, M. F. (2003). Insulin signaling in health and disease. *Science*, 302(5651):1710–1711.
- WIKSTROM, J. D., KATZMAN, S. M., MOHAMED, H., TWIG, G., GRAF, S. A., HEART, E., MOLINA, A. J., CORKEY, B. E., de VARGAS, L. M., DANIAL, N. N., COLLINS, S. i SHIRIHAI, O. S. (2007). beta-Cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels. *Diabetes*, 56(10):2569–2578.
- WIKSTROM, J. D., MAHDAVIANI, K., LIESA, M., SEREDA, S. B., SI, Y., LAS, G., TWIG, G., PETROVIC, N., ZINGARETTI, C., GRAHAM, A., CINTI, S., CORKEY, B. E., CANNON, B., NEDERGAARD, J. i SHIRIHAI, O. S. (2014). Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *EMBO J*, 33(5):418–436.
- WILCKE, M. i NEDERGAARD, J. (1989). Alpha 1- and beta-adrenergic regulation of intracellular Ca²⁺ levels in brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 163(1):292–300.
- WILSON-FRITCH, L., BURKART, A., BELL, G., MENDELSON, K., LESZYK, J., NICOLORO, S., CZECH, M. i CORVERA, S. (2003). Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol*, 23(3):1085–1094.
- WINGE, D. R. (2012). Sealing the mitochondrial respirasome. *Mol Cell Biol*, 32(14):2647–2652.
- WINKLER, E. i KLINGENBERG, M. (1994). Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J Biol Chem*, 269(4):2508–2515.
- WITTIG, I., CARROZZO, R., SANTORELLI, F. M. i SCHAGGER, H. (2006). Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1757(9-10):1066–1072.

- WOYDA-PLOSZCZYCA, A. M. i JARMUSZKIEWICZ, W. (2014). Different effects of guanine nucleotides (GDP and GTP) on protein-mediated mitochondrial proton leak. *PLoS One*, 9(6):e98969.
- YAMAMORI, T., YASUI, H., YAMAZUMI, M., WADA, Y., NAKAMURA, Y., NAKAMURA, H. i INANAMI, O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med*, 53(2):260–270.
- YANG, C. Y. i FROHMAN, M. A. (2012). Mitochondria: signaling with phosphatidic acid. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(8):1346–1350.
- YANG, M., YANG, Y., ZHANG, S. i KAHN, A. M. (2003). Insulin-stimulated hydrogen peroxide increases guanylate cyclase activity in vascular smooth muscle. *Hypertension*, 42(4):569–573.
- YONASHIRO, R., ISHIDO, S., KYO, S., FUKUDA, T., GOTO, E., MATSUKI, Y., OHMURA-HOSHINO, M., SADA, K., HOTTA, H., YAMAMURA, H., INATOME, R. i YANAGI, S. (2006). A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J*, 25(15):3618–3626.
- YOSHIDA, M., MUNHEYUKI, E. i HISABORI, T. (2001). ATP synthase—a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(9):669–677.
- YOSHIKAWA, S. (1999). X-ray structure and reaction mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochem Soc Trans*, 27(4):351–362.
- YOULE, R. J. i NARENDRA, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1): 9–14.
- YOULE, R. J. i van der BLIEK, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337(6098):1062–1065.
- YU, T., SHEU, S. S., ROBOTHAM, J. L. i YOON, Y. (2008). Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res*, 79(2):341–351.

- ZAMPESE, E., FASOLATO, C., POZZAN, T. i PIZZO, P. (2011). Presenilin-2 modulation of ER-mitochondria interactions: FAD mutations, mechanisms and pathological consequences. *Commun Integr Biol*, 4(3):357–360.
- ZARAGOZA, R., RENAU-PIQUERAS, J., PORTOLES, M., HERNANDEZ-YAGO, J., JORDA, A. i GRISOLIA, S. (1987). Rats fed prolonged high protein diets show an increase in nitrogen metabolism and liver megamitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 258(2):426–435.
- ZEMEL, M. B. (2002). Regulation of adiposity and obesity risk by dietary calcium: mechanisms and implications. *J Am Coll Nutr*, 21(2):146S–151S.
- ZEMEL, M. B., SHI, H., GREER, B., DIRIENZO, D. i ZEMEL, P. C. (2000). Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J*, 14(9):1132–1138.
- ZEMEL, M. B., THOMPSON, W., MILSTEAD, A., MORRIS, K. i CAMPBELL, P. (2004). Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obes Res*, 12(4):582–590.
- ZHANG, J. (2013). Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control. *Redox Biol*, 1(1):19–23.
- ZHANG, J. i NEY, P. A. (2010). Reticulocyte mitophagy: monitoring mitochondrial clearance in a mammalian model. *Autophagy*, 6(3):405–408.
- ZHANG, M., MILEYKOVSKAYA, E. i DOWHAN, W. (2005). Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 280(33):29403–29408.
- ZHAO, J., LIU, T., JIN, S., WANG, X., QU, M., UHLEN, P., TOMILIN, N., SHUPLIAKOV, O., LENDAHL, U. i NISTER, M. (2011). Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J*, 30(14):2762–2778.
- ZHU, P. P., PATTERSON, A., STADLER, J., SEEBURG, D. P., SHENG, M. i BLACKSTONE, C. (2004). Intra- and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1. *J Biol Chem*, 279(34):35967–35974.
- ZICK, M., RABL, R. i REICHERT, A. S. (2009). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1793(1):5–19.

ZORZANO, A. (2009). Regulation of mitofusin-2 expression in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*, 34(3):433-439.

ZUNINO, R., BRASCHI, E., XU, L. i MCBRIDE, H. M. (2009). Translocation of SenP5 from the nucleoli to the mitochondria modulates DRP1-dependent fission during mitosis. *J Biol Chem*, 284(26):17783-17795.

Biografija autora

Igor Golić rođen je 19. marta 1981. godine u Bosanskoj Gradišci, Bosni i Hercegovini. Diplomirao je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smjer Biologija, 2008. godine pod mentorstvom prof. dr Aleksandre Korać, sa prosječnom ocjenom u toku studija 9.59. Sljedeće godine upisuje doktorske studije biologije na modulu Biologija ćelija i tkiva.

Od 2010. godine zaposlen je na Katedri za biologiju ćelija i tkiva, prvo kao istraživač pripravnik na projektu 143059 Ministarstva nauke Republike Srbije, a već sljedeće godine kao istraživač saradnik na projektima 173054 i 173055 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Osim navedenih domaćih projekata, angažovan je na međunarodnim projektima (COST akcije), i bilateralnoj saradnji između Republike Srbije i Republike Francuske (Pavle Savić/Hubert Curien).

Član je Srpskog društva za mikroskopiju, Evropskog društva za mikroskopiju (*European Microscopy Society*), Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju, i Društva za mitohondrijalnu fiziologiju (*Mitochondrial Physiology Society*).

Autor je deset radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), tri rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), šest radova u međunarodnim časopisima (M23), jednog rada u međunarodnom časopisu na SCI listi bez impakt faktora (M23a), dva saopštenja sa međunarodnog skupa štampano u cjelini (M33), dvadeset kongresnih saopštenja sa skupova međunarodnih značaja štampanih u izvodu (M34), jednog saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampano u cjelini (M63), i sedamnaest saopštenja sa skupova nacionalnih značaja štampanih u izvodu (M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Игор Љ. Голић

Број уписа Б3402/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

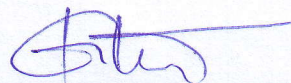
Молекулске основе структурног ремоделирања митохондрија индукованог

калцијумом и инсулином у мрким адипоцитима пацова

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 10.08.2015.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Игор Љ. Голић

Број уписа Б3402/2009

Студијски програм Биологија ћелија и ткива

Наслов рада Молекулске основе структурног ремоделирања митохондрија
индукованог калцијумом и инсулином у мрким адипоцитима
пацова

Ментори Проф. Др Александра Кораћ, редовни професор

Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Др Весна Оташевић, виши научни сарадник

Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић"

Универзитет у Београду

Потписани Игор Љ. Голић

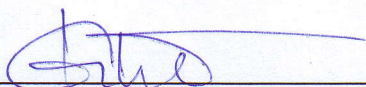
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 10.08.2015.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Молекулске основе структурног ремоделирања митохондрија индукованог калцијумом и инсулином у мрким адипоцитима пацова

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 10.08.2015.

