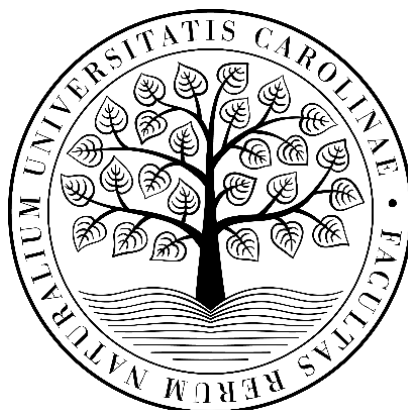


Kreatinkináza a hexokináza v kosterním a srdečním svalu

Homeostáza a protekce



Habilitační práce

RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta

Univerzita Karlova

Praha

2018

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DrSc., který před deseti lety nastoupil jako vedoucí nově vzniklé katedry Fyziologie živočichů a ve velmi krátkém čase vytvořil vhodné podmínky pro její úspěšný rozvoj a přátelské pracovní prostředí, ve kterém vznikla většina přiložených prací. V této souvislosti patří mé upřímné poděkování prof. Františkovi Kolářovi, CSc., RNDr. Janu Neckářovi, Ph.D. a všem členům oddělení Vývojové kardiologie za dlouholetou spolupráci, která přinesla řadu hezkých publikací a obohatila výuku fyziologie na naší katedře i naší laboratoř. Zvláštní poděkování patří paní doc. Olze Novákové, CSc. za velmi přátelskou a dlouholetou spolupráci, též za cenné rady při sepisování této práce. Vřelé poděkování patří RNDr. Daniele Horníkové, Ph.D. za dlouholetou přátelskou spolupráci, významný podíl na praktickém vedení naší laboratoře a všudypřítomnou pomoc. RNDr. Barbaře Elsnicové, Ph.D. děkuji, za otevření světa kvantitativní imunofluorescenční mikroskopie v naší laboratoři, za její krásné obrázky a milou spolupráci. Srdečně děkuji současné vedoucí katedry RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za všestrannou podporu a všem členům katedry za přátelskou atmosféru. Děkuji všem kolegům a spoluautorům, kteří přispěli ke vzniku této práce.

Mé zvláštní poděkování patří všem studentům, kteří se podíleli na přiložených publikacích i těm, kteří v současné době pracují na novém projektu chladové adaptace, za jejich inspiraci, vynikající práci, samostatnost a hezkou atmosféru v laboratoři. Dále děkuji všem postgraduálním studentům, kteří se podíleli a podílejí na výuce praktických cvičení.

Z celého srdce děkuji svým nejbližším, svým dětem, rodičům a přátelům, že měli a mají pochopení pro naši práci a byli mi oporou v uplynulých letech.

OBSAH

1. Úvod	1
2. Cíle	2
3. Seznam příloh 1-17	3
4. Kreatinkinázový systém v kosterním a srdečním svalu	5
4.1. Klinický význam kreatinkinázového systému	6
4.2. Kreatinkinázový systém jako „Master“ energetické rovnováhy	8
4.2.1. <i>Kreatinkinázový systém a produkty hydrolyzy ATP</i>	8
4.2.2. <i>Kreatinkinázový systém jako donor ADP</i>	10
4.3. Interakce kreatinkinázy M se subcelulárními strukturami	12
4.3.1. <i>M-linie sarkomery kosterního svalu</i>	12
4.3.2. <i>Přednostní metabolický tok neboli „substrate channelling“</i>	13
4.3.3. <i>Charakterizace vazby CKM v M-linii sarkomery</i>	15
5. Kardioprotektivní fenotyp srdce adaptovaného na chronickou hypoxii	18
5.1. Kreatinkinázový systém v hypoxii	19
5.1.1. <i>Exprese a aktivita izoforem kreatinkinázy</i>	19
5.1.2. <i>Lokalizace izoforem kreatinkinázy v M-linii sarkomery</i>	21
5.2. Úloha HIF/AKT/HK v kardioprotektivním fenotypu adaptace na hypoxii	23
5.2.1. <i>Adaptace na hypoxii a hypoxii indukovaný faktor HIF</i>	23
5.2.2. <i>Izofomy HIF v hypoxickém a hypertrofovaném srdci u kmenů Wistar a SHR</i>	24
5.2.3. <i>Protein kináza B (Akt) v srdci</i>	26
5.2.4. <i>Lokalizace izoforem Akt v kardiomyocytech</i>	27
5.3. Izofomy hexokinázy v srdci	30
5.3.1. <i>Exprese izoforem hexokinázy po adaptaci na hypoxii</i>	31
5.3.2. <i>Asociace izoforem hexokinázy s mitochondriemi je protektivní</i>	33
5.3.3. <i>Vliv hypoxie a hypertrofie na lokalizaci izoforem hexokinázy</i>	34
5.4. Odpověď srdce na kardioprotektivní režim mírné a extrémní hypoxie se liší	36
6. Souhrn	39
7. Závěr	41
8. Reference	42
9. Přílohy 1 - 17	55

1. ÚVOD

Udržování energetické homeostázy při fyzické zátěži a v patologických stavech je klíčovým úkolem pro zachování integrity myocytů, a tedy zdraví srdce a kosterního svalu. Kreatinkinázový systém (CK) představuje hlavní rychle dostupnou energetickou rezervu pro svalové buňky, zatímco aktivita signální dráhy zahrnující proteinkinázu B (Akt) a hexokinázu (HK) určuje kapacitu transportu glukózy do nitra buněk a následné glykolýzy. CK a HK vytváří prostorově uspořádané systémy, které významně propojují dráhy glykolytické a oxidativní tvorby ATP s místy jeho spotřeby, a tím se podílejí na zachování energetické homeostázy myocytů. Zároveň bylo zjištěno, že tyto enzymy jsou zapojeny v mechanismu endogenní cytoprotekce.

Srdce i kosterní sval potřebují pro svůj výkon trvalý přísun energie k udržení vysokého poměru ATP/ADP, který je nezbytný pro optimální aktivitu ATPáz v průběhu svalové kontrakce a relaxace. Avšak poměr ATP/ADP není dostatečně citlivým indikátorem energetického stavu, neboť svalové buňky mají řadu systémů, které tento poměr udržují na vysoké úrovni i při zhoršené energetické bilanci. Naproti tomu se jako dobrý indikátor energetického stavu buňky ukázal poměr kreatinfosfátu (PCr) a ATP, který může odrážet kontraktální dysfunkci ve spojení s energetickým stavem. Snížení tohoto poměru je průvodním znakem patologických stavů u kosterních svalů i srdce a dysfunkce CK může být předzvěstí srdeční ischemické příhody. Naopak stimulace CK po podání kreatinu brání ztrátám svalové hmoty, zlepšuje kontraktální funkci kosterních svalů a má i pro srdce pozitivní důsledky. Aktivní CK systém též snižuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) modulací mitochondriálního membránového potenciálu, podobně jako HK asociovaná s vnější mitochondriální membránou. Nedávno bylo zjištěno, že zvýšená asociace HK2 se srdečními mitochondriemi se podílí na regulaci signální dráhy endogenní kardioprotekce tak, že snižuje pravděpodobnost otevření mitochondriálního permeabilního póru (MPT póru), a tím snižuje pravděpodobnost aktivace apoptózy zprostředkované mitochondriální cestou.

Studium systémů CK a HK je proto významné pro pochopení jejich role za fyziologických podmínek, a následně za různých patologických stavů. Neméně významné je studium možných protektivních intervencí, které kapacitu CK a HK posilují, a tím zvyšují odolnost kosterních svalů i srdce k náhlému přetížení či ischemickému poškození. Zjistili jsme, že jednou z těchto intervencí může být adaptace na chronickou hypoxii, která je známá svými kardioprotektivními účinky.

2. CÍLE

Hlavním cílem této práce bylo shrnout naše dosavadní výsledky týkající se CK systému a cytoprotektivní dráhy hypoxií indukovaného faktoru HIF, proteinkinázy B (Akt) a hexokinázy 2 (HK2), které jsme získali v průběhu minulých let na modelu laboratorního potkana a králíka.

Dílčí cíle:

- i)** Kvantifikovat přednostní metabolický tok neboli „substrate channeling“ mezi myozínovou ATPázou a myofibrilární kreatinkinázou CKM vázanou v M-linii sarkomery kosterního svalu.
- ii)** Popsat konformační změny CKM v závislosti na vazbě substrátů a charakterizovat vazbu CKM v M-linii sarkomery kosterního svalu za těchto podmínek.
- iii)** Kvantifikovat změny CK systému v levé a pravé komoře srdce po adaptaci na kardioprotektivní a neprotektivní režimy hypoxie.
- iv)** Zjistit úlohu izoform hexokinázy (HK1 a HK2) v oblasti mitochondrií v srdci po adaptaci na kardioprotektivní režimy mírné a extrémní hypoxie.
- v)** Sledovat změny v signální dráze hypoxií indukovaného faktoru HIF a protein kinázy B (Akt) po adaptaci na mírnou a extrémní hypoxii.
- vi)** Posoudit míru aktivace Akt/HK2 protektivní dráhy v průběhu krátkodobé ischemie a reperfuze po adaptaci na mírnou hypoxii.
- vii)** Posoudit vliv mírné a extrémní hypoxie na odpověď antioxidantního systému, β -adrenergní signalizace v levé komoře srdce.

3. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Stefl B, Mejsnar JA, **Karasová J**. Levels of energy-related metabolites in intact and isolated perfused-superfused rat skeletal muscles. *Physiol Res*. 1994;43(3):175-80.

Příloha 2: Gregor M, Mejsnar J, Janovská A, **Zurmanova J**, Benada O, Mejsnarová B. Creatine kinase reaction in skinned rat psoas muscle fibers and their myofibrils. *Physiol Res*. 1999;48(1):27-35.

Příloha 3: Gregor M, Janovská A, Stefl B, **Zurmanova J**, Mejsnar J. Substrate channelling in a creatine kinase system of rat skeletal muscle under various pH conditions. *Exp Physiol*. 2003 Jan;88(1):1-6.

Příloha 4: **Zurmanova J**, Difato F, Malacova D, Mejsnar J, Stefl B, Zahradnik I. Creatine kinase binds more firmly to the M-band of rabbit skeletal muscle myofibrils in the presence of its substrates. *Mol Cell Biochem*. 2007;305(1-2):55-61.

Příloha 5: Hornikova D, Herman P, Mejsnar J, Vecer J, **Zurmanova J**. Creatine kinase structural changes induced by substrates. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Feb;1794(2):270-4.

Příloha 6: Arnostova P, Jedelsky PL, Soukup T, **Zurmanova J**. Electrophoretic mobility of cardiac myosin heavy chain isoforms revisited: application of MALDI TOF/TOF analysis. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:634253.

Příloha 7: **Zurmanová J**, Soukup T. Comparison of myosin heavy chain mRNAs, protein isoforms and fiber type proportions in the rat slow and fast muscles. *Physiol Res*. 2013;62(4):445-53.

Příloha 8: Waskova-Arnostova P, Elsnicova B, Kasparova D, Sebesta O, Novotny J, Neckar J, Kolar F, **Zurmanova J**. Right-to-left ventricular differences in the expression of mitochondrial hexokinase and phosphorylation of Akt. *Cell Physiol Biochem*. 2013;31(1):66-79.

Příloha 9: Waskova-Arnostova P, Kasparova D, Elsnicova B, Novotny J, Neckar J, Kolar F, **Zurmanova J**. Chronic hypoxia enhances expression and activity of mitochondrial creatine kinase and hexokinase in the rat ventricular myocardium. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(2):310-20.

Příloha 10: Waskova-Arnostova P, Elsnicova B, Kasparova D, Hornikova D, Kolar F, Novotny J, **Zurmanova J**. Cardioprotective adaptation of rats to intermittent hypobaric hypoxia is accompanied by the increased association of hexokinase with mitochondria. *J Appl Physiol* (1985). 2015 Dec 15;119(12):1487-93.

Příloha 11: Kolar D, Gresikova M, Waskova-Arnostova P, Elsnicova B, Kohutova J, Hornikova D, Vebr P, Neckar J, Blahova T, Kasparova D, Novotny J, Kolar F, Novakova O, **Zurmanova JM**. Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult. *Mol Cell Biochem*. 2017 Aug;432(1-2):99-108.

Příloha 12: Neckář J, Svatoňová A, Weissová R, Drahota Z, Zajíčková P, Brabcová I, Kolář D, Alánová P, Vašínová J, Šilhavý J, Hlaváčková M, Tauchmannová K, Milerová M, Ošťádal B, Červenka L, **Zurmanova J**, Kalous M, Nováková O, Novotný J, Pravenec M, Kolář F. Selective replacement of mitochondrial DNA increases cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*. 2017 May 1;131(9):865-881.

Příloha 13: Brabcova I., Kolar D., Elsnicova B., Hornikova D., Novotny J., Kalous M., Pravenec M., Neckar J., Kolar F. and **Zurmanova J**. Mitochondrial genome modulates myocardial Akt/Glut/Hk salvage pathway in spontaneously hypertensive rats adapted to chronic hypoxia". *Physiological Genomics (under revision)*.

Příloha 14: Radosinska J, Bacova B, Knezi V, Benova T, **Zurmanova J**, Soukup T, Arnostova P, Slezak J, Goncalvesova E, Tribulova N. Dietary omega-3 fatty acids attenuate myocardial arrhythmogenic factors and propensity of the heart to lethal arrhythmias in a rodent model of human essential hypertension. *J Hypertens*. 2013 Sep;31(9):1876-85.

Příloha 15: Kasparova D, Neckar J, Dabrowska L, Novotny J, Mraz J, Kolar F, **Zurmanova J**. Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiol Genomics*. 2015 Dec;47(12):612-20.

Příloha 16: Hahnova K, Kasparova D, **Zurmanova J**, Neckar J, Kolar F, Novotny J. β -Adrenergic signaling in rat heart is similarly affected by continuous and intermittent normobaric hypoxia. *Gen Physiol Biophys*. 2016 Apr;35(2):165-73.

Příloha 17: Micova P, Hahnova K, Hlavackova M, Elsnicova B, Chytilova A, Holzerova K, **Zurmanova J**, Neckar J, Kolar F, Novakova O, Novotny J. Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A₂ α /cyclooxygenase 2 pathway via β ₂-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation. *Mol Cell Biochem*. 2016 Dec;423(1-2):151-163.

4. KREATINKINÁZOVÝ SYSTÉM V KOSTERNÍM A SRDEČNÍM SVALU

Kreatinkinázový systém (CK systém) je jediným fosfagenovým systémem u obratlovců. V živočišné říši se vyvinulo sedm těchto systémů a hlavní uplatnění nacházejí převážně v excitabilních tkáních, kde překlenují náhlé výkyvy v požadavku na dodávku energie. V menší míře jsou přítomny i v ostatních tkáních, kde mají modulační funkci^{1,2}. Hlavní funkcí CK systému v kosterních svalech a v srdci, je udržovat vysoký a stálý poměr ATP/ADP při náhlém i trvale zvýšeném požadavku na dodávku energie¹. CK systém je považován za prostorový energetický pufr, který umožňuje tvorbu, přenos a využití kreatinfosfátu (PCr) mezi místy spotřeby energie (ATPázy) a místy její produkce (glykolýza a oxidativní fosforylace). Jeho molekula snadno difunduje do okolí, neboť je významně menší než molekula ATP a ve srovnání s ostatními fosfageny v živočišné říši má PCr jednu z nejvyšších difúzních konstant³⁻⁵.

CK systém se v příčně pruhovaných svalech skládá z kreatinu, jeho fosforylované formy a čtyř izoform kreatinkinázy (CK). Dvě izoformy jsou cytosolické CKM (muscle), CKB (brain) a jedna je mitochondriální tzv. sarkomerická mtCKs (sarcomeric). Vedle toho se v ostatních tkáních vyskytuje tzv. všudypřítomná mitochondriální mtCKu (ubiquitous). Cytosolické izoformy se vyskytují jako dimery, ve zralém kosterním i srdečním svalu se nachází převážně homodimer CKMM, avšak v srdci se v malém množství vyskytuje také homodimer CKBB a heterodimer CKMB (pro přehled⁶⁻¹⁰). CKB izoforma je dominantní ve fetálním srdci i myoblastech kosterní svaloviny¹¹, dále je typická pro neurony a byla nalezena ve většině neexcitabilních tkání¹². Pokud dochází k nadměrnému zatížení zralého srdce, zvyšuje se exprese fetálních genů, které jsou součástí adaptivní odpovědi, a za těchto okolností vzrůstá i exprese minoritní CKB izoformy (**Příloha 8**)⁹. Mitochondriální izoformy tvoří přechodné homo-dimery a za funkční terciální strukturu jsou považovány stabilní oktamery, lokalizované v inter-membránovém prostoru mitochondrií¹³. Překvapivě, v levé srdeční komoře jsme stanovili poměr hladin mRNA CKM a CKB 1: 1, zatímco mitochondriální mtCKs mRNA měla hladinu o řád vyšší (Kasparova D, nepublikované výsledky).

Funkční spojení mezi cytosolickými izoformami a mitochondriálními izoformami CK, které na jedné straně podporuje funkci ATPáz a na druhé straně využívá ATP k vytváření zásobního poolu PCr, bylo popsáno v kosterním svalu i v srdci jako „CK/PCr shuttle“^{6,14}.

4.1. Klinický význam kreatinkinázového systému

Cytosolické izoformy CKM a CKB jsou v obecném povědomí jako jeden z markerů akutního infarktu myokardu v séru ve formě CKMB dimeru. Ke zvýšení CKM v séru též dochází u myopatických stavů anebo po výkonu u vrcholových sportovců¹⁵⁻¹⁸. Existují klinické stavy nebo genetické vady, které vedou ke snížení anebo k úplnému potlačení funkce CK systému¹⁹⁻²¹. Míra postižení mimo jiné závisí na tom, zda se svalová buňka vyvíjí již s tímto defektem a dojde k adaptačním změnám na tuto situaci²², anebo zda k defektu dochází později u zralé, plně diferencované svalové buňky a v tomto případě jsou následky podstatně závažnější²³. Porucha CK systému může v principu nastat ve dvou základních rovinách, buď je deficit v enzymatické části systému, anebo není dostupný kreatin jako substrát²⁴.

Na modelech myši s různým typem deficience CK izoform se překvapivě projevila změna fenotypu svalu a srdce poměrně mírně, obzvláště u delece cytosolické CKM^{-/-} izoformy, což může souviset s adaptivními změnami v oblasti prostorového uspořádání myocytu a zmnožením mitochondrií²⁵, které posílí přímou dodávku ATP k ATPázám. Delece CKM nezměnila sílu stahu, ale snížila rychlost kontrakce a zvířata neudržela maximální výkon²⁶⁻²⁸. Obnovení CK systému vedlo k výraznému zlepšení svalové kontrakce²⁹. Podstatně výraznější následky byly patrné u delece mtCKs^{-/-} a u současné delece obou zmíněných izoform, CKM a mtCKs^{30,31,32}. Zde se nabízí možnost, že v cytosolické části CK systému mohou sehrát významnou kompenzační roli jak morfologické změny, tak kompenzační nárůst minoritní izoformy CKB, zatímco v mitochondriální části k podstatné kompenzaci nedochází. Později bylo ukázáno, že se s věkem progresivně zhoršuje stav myši v závislosti na typu deficience³¹. Na druhé straně, nadměrná exprese CKM dokázala předejít tlakovému přetížení a následnému selhání srdce u myši³³. Tento zásah může účinně stimulovat glykolýzu a tlumit mitochondriální produkci ROS v přetíženém srdci, zvýšením dostupnosti Pi³⁴.

Co se týká neenzymatické části CK systému, existuje mnoho prací, které dokumentují benefiční a cytoprotektivní účinky jak samotného kreatinu, tak jeho působení v součinnosti s CK. Na buněčných kulturách i v souvislosti s kardioprotekcí byly potvrzeny prokazatelné antioxidační a anti-apoptotické účinky kreatinu³⁵⁻⁴¹. Bylo doloženo též snížení zánětlivé odpovědi po jeho zvýšené suplementaci^{38,41}. Nedávno byl pozorován pozitivní vliv PCr na buněčné membrány, kdy jeho přítomnost zvýšila stabilitu membrán a vzrostla jejich odolnost proti oxidativnímu stresu vyvolanému doxorubicinem⁴². Úspěšné bylo podávání PCr i v klinické praxi, kdy za bezpečnou dávku při chronickém podávání u lidí byly stanoveny 4g/den⁴³⁻⁴⁹. U kosterního svalu podávání kreatinu zabránilo ztrátě svalové hmoty, posílilo

kontraktilní funkci v průběhu stárnutí⁵⁰⁻⁵³ a zlepšilo maximální anaerobní svalový výkon u netrénovaných jedinců, zatímco u trénovaných nemělo vliv. Existují však i studie, které významné zlepšení u věkově pokročilé skupiny nepozorovaly⁵⁴. Kardioprotektivní efekt zvýšené dostupnosti kreatinu byl prokázán na úrovni zlepšení kontraktilní funkce, snížení počtu reperfúzních arytmií a snížení pravděpodobnosti otevření MPT póru (*mitochondrial permeability transition pore*)^{55,56}. V klinické praxi je však zvýšení dostupnosti kreatinu pro srdce problematické vzhledem k jeho omezené transportní kapacitě do kardiomyocytů. Proto se v současné době zvažuje jeho podávání ve formě vhodného analogu, který by zvýšenou dodávkou kreatinu do srdce umožnil⁵⁷.

Ukazuje se, že hladina PCr, tedy poměr PCr/ATP nebo tzv. kreatinový náboj [PCr]/[PCr]+[Cr] (**Příloha 1**) velmi citlivě odráží energetický stav svalových buněk na rozdíl od poměru ATP/ADP. To pravděpodobně souvisí s tím, že ve svalových buňkách existuje více mechanismů, které udržují stálý poměr ATP/ADP, případně ATP/AMP co nejdéle, aby byla zachována funkce a integrita myocytů. V klinické praxi byl pozorován pokles PCr ještě před nástupem srdeční dysfunkce u hypertrofovaného srdce a u srdce diabetických pacientů jako předzvěst ischemické příhody. Dále snížení CK aktivity na polovinu bylo pozorováno u selhávajícího srdce a snížený poměr PCr/ATP je závažným indikátorem pokročilého stádia u pacientů s dilatační kardiomyopatií⁵⁸⁻⁶³. Dysfunkce CK systému byla též pozorována u pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Na druhé straně posílení CK systému podáváním PCr zlepšilo na více úrovních průběh pooperačních stavů kardiopulmonálního bypassu; snížilo výskyt arytmií, zvýšilo ejekční frakci, snížilo hladiny CKMB v krvi a snížilo mortalitu pacientů se suplementací ve srovnání s ostatními pacienty⁶⁴. Ovšem stále není zcela jasný mechanismus působení suplementace PCr, neboť nebyl dosud prokázán jeho transport do kardiomyocytů.

Z výše uvedeného vyplývá, že nové poznatky týkající se funkce CK systému a jeho přirozeného i exogenního posílení mohou najít významné klinické uplatnění v nových terapeutických přístupech i v prevenci kardiovaskulárních chorob a oslabení svalové funkce vlivem stárnutí. Dosud není jasné, zda chronická suplementace kreatinem je přínosná u myopatických stavů, neboť akutní podání u zdravých jedinců na svalový výkon nemělo vliv⁶⁵.

4.2. Kreatinkinázový systém jako „Master“ energetické rovnováhy

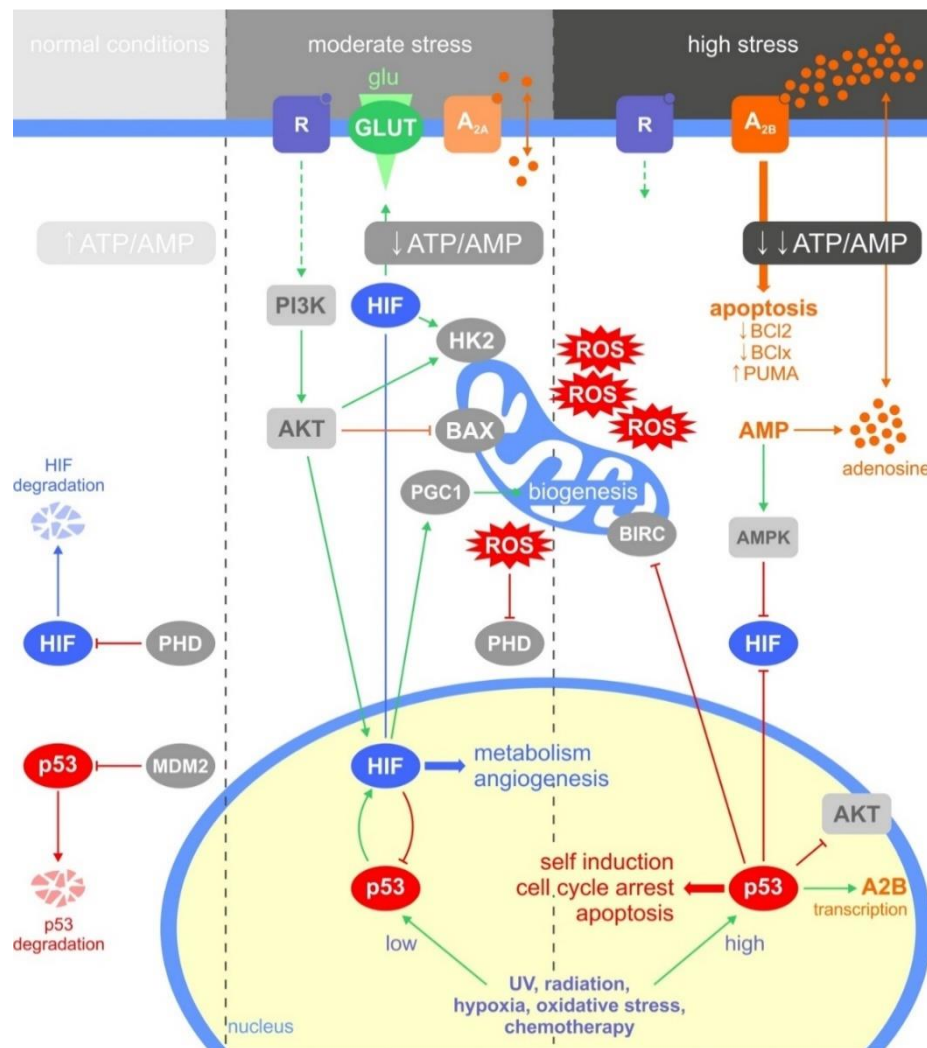
4.2.1. Kreatinkinázový systém a produkty hydrolyzy ATP

CK systém zajišťuje důležité propojení mezi aerobním a anaerobním metabolismem. Nedávno byly přehledně popsány tzv. intracelulární energetické jednotky (IEU) v srdečním svalu, které postihují souvislosti vysoce kompartmentalizovaného prostředí svalové buňky se sníženou difuzní kapacitou a k tomu přizpůsobenou organizaci energetického systému. Autoři zdůrazňují, že existence IEU umožňuje integraci mnoha energetických toků tak, aby bylo dosaženo co největší účinnosti v produkci a využití ATP^{66,67}. Na vrcholu této pomyslné energetické pyramidy stojí CK systém, který je již slepou větví energetického metabolismu a produkuje energeticky vysoce bohatý PCr.

CK reakce ($\text{PCr} + \text{ADP} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{ATP} + \text{Cr}$) probíhá blízko rovnováhy a její směr tedy určuje hodnota volné Gibbsovy energie, dostupnost substrátů a koncentrace produktů v daném kompartmentu (**Přílohy 1 a 2**)^{68–70}. CK společně s adenylátkinázovou (AK) reakcí ($2\text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$)⁷¹ poskytují regeneraci ATP s nejvyšší rychlostí (zhruba $30 \mu\text{mol}/\text{sec} \cdot \text{g}$ tkáně), která je zhruba o řád vyšší než rychlost syntézy ATP pomocí oxidativní fosforylace a až o dva řády vyšší než syntéza ATP *de novo*^{72–74}. Z tohoto důvodu jsou tyto systémy též nazývány časovými energetickými pufry^{71,75}. PCr/CK působí v blízkosti ATPáz při náhlé zátěži, tím překlenuje krátké, ale významné období před plnou aktivací glykolýzy a oxidativní fosforylace. Tímto brání akumulaci produktů hydrolyzy ATP, (ADP a H^+) v daném kompartmentu, což umožňuje maximální výkon ATPáz. Vysoký poměr ATP/ADP, podobně jako ATP/AMP, nepřímo zabraňuje nadměrné ztrátě nukleotidů z buňky, které prostupují buněčnou membránou ve formě degradačních produktů AMP^{69,76}. Na druhé straně, tyto degradační produkty, adenosin nebo inosin dále plní důležité signální funkce.

Adenosin je považován za důležitý senzor energetického stavu buňky a lokální regulátor krevního průtoku^{77–81}. Zjednodušeně řečeno, adenosin v malém množství stimuluje vazodilataci a zároveň zpětnou vazbou skrze vysokoafinitní adenosinové receptory typu $\text{A}_{2\text{A}}$ podporuje energetický metabolismus buňky stimulací glukózového metabolismu a jeho signálních drah. Avšak v kritickém případě, kdy množství adenosinu významně vzroste, dochází k aktivaci $\text{A}_{2\text{B}}$ receptorů s nízkou afinitou a následně k aktivaci pro-apoptotických drah (Obr. 1). Aktivace adenosinových receptorů $\text{A}_{1\text{A}}$ ve spojení s inhibiční dráhou spojenou s G_i proteiny má negativně chronotropní vliv na činnost srdce, což může oddálit depleci energetických zásob v případě energetického přetížení^{77,82}. Pokles poměru ATP/AMP též

stimuluje AMPK (AMP aktivovanou proteinkinázu), která je neméně důležitý regulátor energetického metabolismu⁸³⁻⁸⁵, ale i buněčné smrti⁸⁶. CK systém je výše uvedeným drahám nadřazený tím, že udržuje vysoké poměry ATP/ADP, ATP/AMP a pokud je plně funkční, brání jejich vysoké aktivaci. V konečném důsledku předchází spuštění pro-apoptotických drah v zátěžových a hypoxických podmínkách^{9,87,88}.



Obrázek 1: Schéma vlivu adenosinu na stimulaci energetického metabolismu a aktivaci apoptózy v závislosti na míře jeho extracelulární koncentrace. Signální dráhy adenosinových receptorů (A_{2A}, A_{2B}), fosfoinozimid-3-kinázy/protein kinázy B (PI3K/AKT), hypoxií indukovaného faktoru (HIF) a tumor supresorového proteinu p53. Tyto dráhy ovlivňují glukózový a mitochondriální metabolismus na úrovni exprese i vnitrobuněčné translokace, dále udržují rovnováhu mezi pro-apoptotickými a anti-apoptotickými procesy v závislosti na energetickém stavu buňky (Zkratky: R- receptor, BAX, PUMA - proapoptotické proteiny, Bcl2, Bclx, Birc, - antiapoptotické proteiny, PHD - prolylhydroxylázy, GLUT- glukózové transportéry, HK2 – hexokináza 2, PGC1 - koaktivátor 1 aktivovaného receptoru gama proliferace peroxisomů, MDM2 - onkoprotein regulující p53 (autoři obrázku: M. Hock a J.Žurmanová).

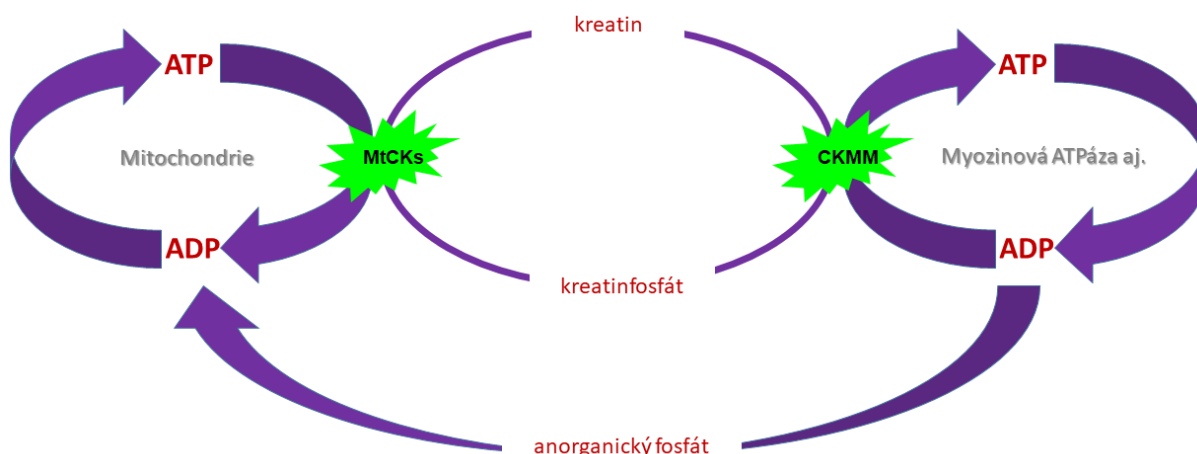
4.2.2. Kreatinkinázový systém jako donor ADP

Enzymy, které ovlivňují poměr ATP/ADP, mají v místech produkce ATP velmi důležitou úlohu. Jejich aktivita brání lokální akumulaci ATP a současně zvyšuje množství ADP, které stimuluje jak glykolýzu, tak komplex V respiračního řetězce, a tím pozitivně ovlivňují respiraci mitochondrií a mitochondriální membránový potenciál. Do této skupiny enzymů patří tři izoformy hexokinázy (HK 1-3), které za určitých okolností asociují s vnější membránou mitochondrií (**Příloha 10**), dále adenylát kináza AK2, která je spolu s mtCKs lokalizována v intermembránovém prostoru mitochondrií⁸⁹ a v neposlední řadě mitochondriální mtCKs. Na uvedené enzymy můžeme v mitochondriálním kompartmentu pohlížet jako na přímé donory ADP pro ATP syntázu a je důležité zmínit, že CK a AK katalyzují reakce probíhající blízko rovnováhy, zatímco HK nikoliv. Jaká je mezi zmíněnými donory ADP souhra ve fyziologických podmínkách, není dosud přesně známo a naší snahou bylo k tomuto poznání alespoň částečně přispět. Při pokusu o celkový pohled nám mohou pomoci známé informace týkající se jejich rozdílných afinit k substrátům, odlišné odolnosti k oxidativnímu stresu a odlišné lokalizaci⁹⁰. HK izoformy, lokalizované vně mitochondriální membrány asociují s aniontovým kanálem VDAC (*voltage dependent anion channel*). Mitochondriální mtCKs asociuje též s VDAC stejně jako HK, ale z vnitřní strany vnější mitochondriální membrány, kde vytváří tzv. „kontaktní místa“ s nukleotidovým translokátorem ANT (*adenin nucleotide translocator*) prostupujícím vnitřní mitochondriální membránu. MtCKs též vytváří spojení v kristách vnitřní membrány^{91–96}. Je pozoruhodné, že tyto dva enzymy, tetramer HK a oktamer mtCKs, mající vazebná místa na protilehlé straně VDAC, mají ve funkčním stavu velmi blízkou molekulovou hmotnost (190 kD mtCKs, 199 kD HK3, 204 kD HK1-2 u lidí). V oblasti VDAC a ANT dochází k formování MPT póru, které je doprovázeno rozpadem funkčního oktameru mtCKs^{97,98}.

Oktamer mtCKs je funkčně spřažen s ATP syntázou tak, že kreatin vstupující do mitochondrií přes VDAC, je transfosforylován na PCr pomocí ATP produkovaného oxidativní fosforylací. Nově vzniklý PCr difunduje do cytoplazmy, zatímco ADP je přednostně transportován do matrix prostřednictvím ANT. Zvýšená dostupnost ADP zvyšuje aktivitu ATP syntázy, posiluje míru spřažení oxidativní fosforylace a tím udržuje mitochondriální membránový potenciál na přiměřeně nízké úrovni, což má cytoprotektivní a kardioprotektivní účinky^{99–101} (Obr. 2). Bylo potvrzeno, že mtCKs zároveň nepřímo inhibuje otevření MPT póru^{40,96}, jehož aktivace může být vyvolána vysokým oxidativním stresem ve spojitosti s metabolickým stavem, a výrazně se podílí na spuštění apoptózy mitochondriální cestou^{102,103}.

Při funkčním CK systému není tedy mitochondriální respirace regulována cytosolickým ADP, ale intra-mitochondriálním ADP, které je závislé na dostupnosti kreatinu procházejícím VDAC k mtCKs^{75,104,105}.

Nedávno bylo potvrzeno, že CK systém působí jako robustní časový energetický pufr, který předchází oscilacím v mitochondriálním metabolismu, nicméně jeho příspěvek ve smyslu prostorového energetického pufru má více omezené možnosti působení, než se dříve předpokládalo. Byly experimentálně doloženy již dříve vyslovené teoretické předpoklady, že zvýšená aktivita mtCK snižuje cytosolický Pi, zatímco cytosolické izoformy CK mají opačný efekt¹⁰⁶, který stimuluje glykolýzu a oxidativní fosforylaci. U modelů s nadměrnou expresí mtCK došlo ke zrychlené odpovědi oxidativní fosforylace na zvýšené zatížení srdce, zatímco při nadměrné expresi cytosolických izoform došlo ke zpomalení mitochondriální odpovědi, což souvisí s obratem adeninových nukleotidů³⁴.



Obrázek 2. Schéma spřažení mitochondriální kreatinkinázy MtCKs s produkcí ATP oxidativní fosforylací (vlevo) a cytosolické CK (CKM) s hydrolýzou ATP (vpravo). Následné funkční propojení těchto cyklů difundujícími molekulami kreatinu a kreatinfosfátu v cytosolu tzv. „Kreatinfosfátový shuttle“. (Inspirace Wegmann et al.1992)⁷.

4.3. Interakce kreatinkinázy M se subcelulárními strukturami

Předpokládá se, že na subcelulární struktury je vázáno zhruba 50 % z celkové solubilní cytosolické isoformy CKM. Většinou se jedná o membránové struktury a jediná dosud popsaná vazba s cytoskeletálními proteiny je vazba CKM v M-linii sarkomery, která odpovídá zhruba 10 % celkové CKM^{7,107–109}. Jedná se o první známou asociaci u CKM izoformy a byla jí připisována i strukturální role^{7,69,107,109,110}. Později bylo zjištěno, že vazba myofibrilární CKM je reverzibilní^{111,112}. Naše práce ukázala, že lze CKM vytěsnit z M-linie vyšší koncentrací značené exogenní CK a že její vazba v M-linii je dynamická v závislosti na okolních podmínkách (**Příloha 4**). Další autoři lokalizovali CKM také v I-pruhu sarkomery, kde pravděpodobně podporuje glykolýzu snížením poměru ATP/ADP^{113,114}. Tato lokalizace může hrát významnou úlohu v raném postnatálním srdci i kosterním svalu, kdy struktura M-linie sarkomery není ještě ustavena¹¹⁵. V souladu s tím byla popsána asociace CKM s fosfofruktokinázou (PFK). Asociace obou enzymů vykazovala závislost na pH, kdy okyselené prostředí zvyšovalo sílu interakce ve srovnání s neutrálním prostředím^{114,116}. Byla zjištěna další asociční místa CKM na sarkolemě v asociaci s Na/K ATPázou^{113,117,118} a výměníkem sodných a vápenatých iontů NCX¹¹⁹. Neméně významnou je asociace CK i v blízkosti K_{ATP} kanálu, kde společně s AK vytváří tzv. metabolický senzor, který propojuje excitabilitu srdeční buňky s jejím metabolickým stavem^{120,121}. K_{ATP} kanál je klíčovým bodem pro zpětnovazebnou regulaci kontraktility srdce v závislosti na energetickém stavu při nadměrné zátěži. CKM byla detekována též v oblasti sarkoplazmatického retikula^{122,123}, kde podporuje činnost Ca/Mg-ATPázy (SERCA), a tím ovlivňuje průběh relaxace kosterního svalu a diastolické fáze u srdce.

4.3.1. M-linie sarkomery kosterního svalu

Pomalé a rychlé svaly se liší nejen svým metabolismem a zastoupením těžkých řetězců myozínu, ale i zastoupením strukturálních proteinů v sarkomeře, které ovlivňují její mechanické vlastnosti¹²⁴ (**Přílohy 6 a 7**). V laboratoři prof. Thornella bylo zjištěno, že struktura H-pruhu sarkomery se jednoznačně liší mezi svaly, které jsou inervované rychlým a pomalým motoneuronem, zatímco jiné parametry, jako počet mitochondrií, čas kontrakce či šíře Z-disku, se jeví velmi variabilní a nelze je použít jako jednoznačné identifikační znaky. Autoři ve své práci dokládají, že pomalé svaly potkana (např. *m. soleus*) inervované pomalými motoneurony, neobsahují 165 kD M-protein v H-pruhu, který u těchto pomalých svalů obsahuje čtyři M-linie tvořené M4,4' a M6,6' můstky. Naopak v H-pruhu u rychlých svalů (např. *m. anterior tibialis*),

kde je lichý počet M-linií, byl M-protein identifikován^{126–128}. Přítomnost M-proteinu zvyšuje pevnost sarkomery a současně snižuje její pružnost¹²⁴. Předchozí studie pomocí specifických protilátek ukázaly, že CKM je lokalizována symetricky ve dvou M-liniích H-pruhu, které odpovídají M4 a M4' můstkům^{110,129}. Později byly stanoveny disociační konstanty CKM a jejích vazebných proteinů při pH 6,8 v rozsahu 50-100 nM pro myomezín a okolo 1 μ M pro M-protein¹³⁰. Z uvedeného vyplývá, že CKM lokalizovaná v M-linii sarkomery má odlišné vazebné podmínky u pomalého a rychlého svalu, a proto se může síla a dynamika její vazby lišit v závislosti na fenotypu svalu.

Modelem pro naše studie, které jsou uvedeny jako přílohy následující kapitoly, byl rychlý kosterní sval *m. psoas major* potkana a králíka, u kterého se předpokládá více rozvinutý CK systém než u pomalého svalu. Současně jsou v M-linii rychlého svalu zastoupeni oba vazební partneři pro CKM, myomezín a M-protein. Celá problematika vycházela z předchozích teoretických studií^{87,131,132}, ze kterých vyplynula hypotéza, předpokládající významnou úlohu konformačních změn CK molekuly v řízení její enzymatické aktivity v závislosti na vazbě substrátů na straně jedné a její interakcí s vazebnými partnery subcelulárních struktur v jednotlivých buněčných kompartmentech na straně druhé. Proto jsme sledovali i) přednostní metabolický tok mezi CKM a myozínovou ATPázou ve fyziologickém rozsahu hodnot pH, ii) konformační změny molekuly CK v závislosti na vazbě substrátu a iii) dynamiku vazby CKM s myofibrilami v závislosti na vazbě substrátu a pH.

4.3.2. Přednostní metabolický tok neboli „substrate channelling“

V 80. a 90. letech minulého století byly intenzivně studovány multienzymové komplexy a mechanismy přednostního metabolického toku¹³³. V současnosti se hovoří o existenci specializovaných buněčných mikro-kompartmentů, mezi kterými dochází k přednostním metabolickým tokům, a tím je zajištěna energetická homeostáza v celé buňce¹³⁴. Jeden z těchto mikro-kompartmentů je lokalizován v A-pruhu sarkomery mezi CKM a myozínovou ATPázou.

Hledali jsme model pro kvantitativní studium funkčního spřažení CKM vázané v M-linii sarkomery s myozínovou ATPázou, který zahrnuje přednostní metabolické toky ATP a ADP mezi těmito enzymy tzv. „substrate channeling“. Testovali jsme různé způsoby permeabilizace svalových vláken a izolované myofibrily. Ve srovnání s permeabilizovanými vlákny, které mají zachovanou kompartmentalizaci svalové buňky, jsme nakonec vyhodnotili izolované myofibrily z *m. psoas major* potkana jako vhodnější model, neboť zde nedochází k interferencím s ostatními buněčnými ATPázami (**Příloha 2**). Příspěvek *substrate*

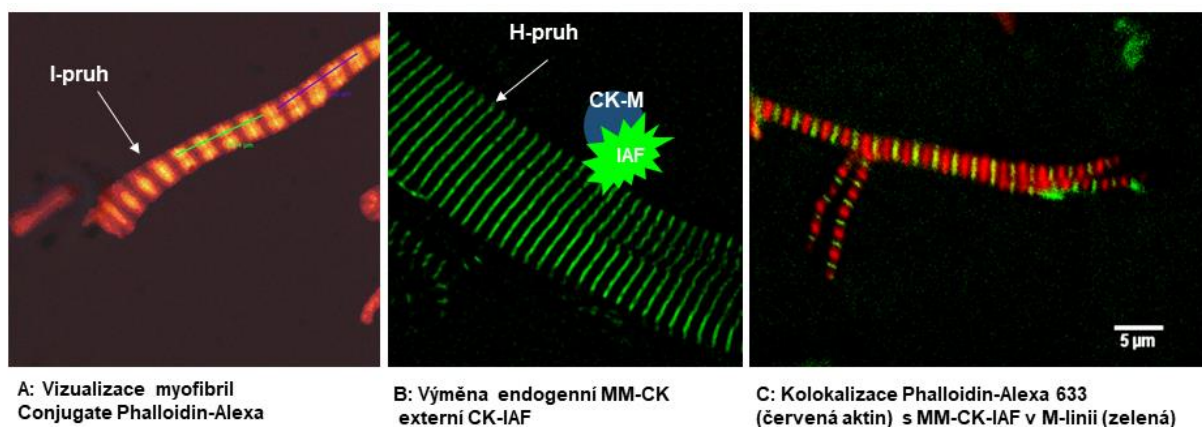
channelingu, jsme vypočítali z naměřené hodnoty uvolněného ATP do média z CK reakce na straně jedné a spotřeby PCr na straně druhé. K měření jsme použili systém spřažených enzymatických reakcí na izolovaných myofibrilách. Oba přístupy jsme testovali na exogenní CKM (Roche GmbH) a nebyly zde zjištěny žádné rozdíly v aktivitě ani při změnách pH v rozsahu 6,0-7,5. V případě měření CK reakce na myofibrilách však docházelo k rozdílu, který odpovídal aktivitě myozínové ATPázy, a tedy ztrátě ATP produkovaného CK reakcí, které bylo přednostně využíváno jako substrát ATPázy. Maximální dosažený rozdíl, který odpovídá *substrate channelingu* mezi CKM a myozínovou ATPázou, byl 42,3 % při pH 6,95 (**Příloha 3**).

Tento výsledek ukázal, že v mírně kyselém pH dochází k maximálnímu využití ATP poskytnutého CK reakcí v M-linii sarkomery. Pravděpodobně za těchto podmínek dochází i k neefektivnějšímu využití ADP pomocí CKM, a jak vyplývá z CK reakce, dochází též k maximálnímu využití H^+ iontů. V souladu s těmito nálezy jsme později potvrdili závislost vazby CKM v M-linii na pH prostředí na izolovaných myofibrilách. Zjistili jsme, že v kyselém pH endogenní CKM nelze vytěsnit z M-linie ani vyššími koncentracemi exogenní CKM a naopak při pH vyšším než 7,1 se vazba CKM s myofibrilami oslabuje a dochází k jejímu samovolnému uvolňování z izolovaných myofibril do média (**Příloha 4**). Naše data byla též v souladu s výsledky studie vazby CKM s myomezímem a M-proteinem na úrovni protein-proteinových interakcí¹³⁰. Naše výsledky ukazují, že regulace „*substrate channelingu*“ může být řízena množstvím CK vázané v M-linii, vedle regulace specifické aktivity CK a myozínové ATPázy. Funkční význam těchto nálezů se dotýká počátku submaximální svalové zátěže, kdy klesá pH, CKM posiluje funkci myozínové ATPázy a stabilizuje svoji vazbu. Vysoká aktivita ATPáz následně vede ke zvýšené produkci P_i , který stimuluje glykolýzu a oxidativní fosforylaci. Současně zvýšená koncentrace Ca^{2+} iontů při stimulaci kontrakce přispívá k odpovídající akceleraci produkce ATP oxidativní cestou. Náš nálezy by mohl také přispět k pochopení změny kontraktility svalů za různých patologických stavů, které zasahují do ultrastruktury M-linie, jako je např. hypertrofie, myopatie a kardiomyopatie spojené s abnormalitami v expresi kontraktálních proteinů. Dále se může jednat o ischemické stavy a zvýšený oxidativní stres, kdy by se mohly měnit podmínky pro vazbu CKM v M-linii sarkomery. Porozumění vazebným podmínkám by mělo přinést hlubší pochopení patologických stavů, které poškozují funkční spřažení mezi CKM a myozínovou ATPázou.

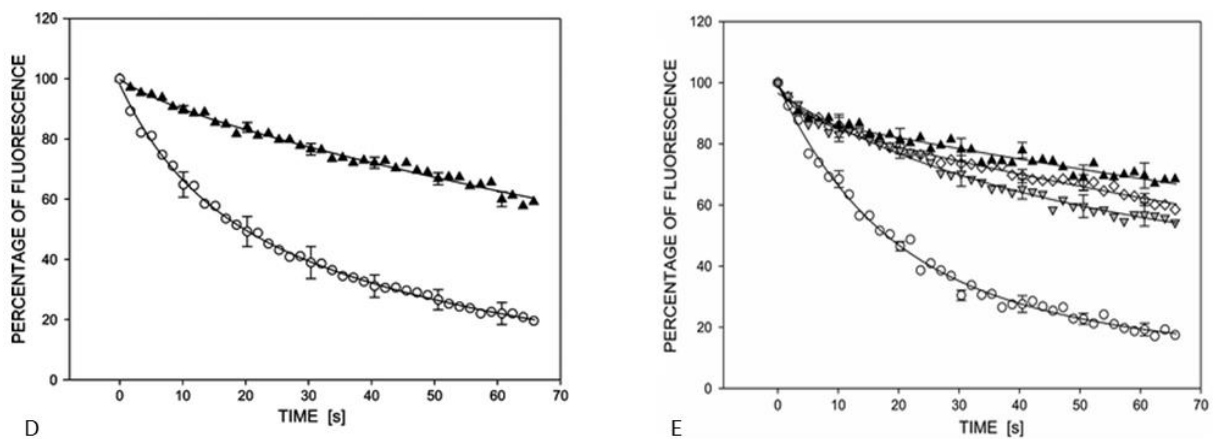
4.3.3. Charakterizace vazby CKM v M-linii sarkomery

V době, kdy jsme hledali vhodný model pro studium vazby CKM v M-linii sarkomery, bylo známo, že CKM přímo interaguje s hlavními strukturálními proteiny M-linie, s myomezímem a s M-proteinem, pomocí N-terminálního konce CKM monomeru^{130,135}. Horneman et al. též identifikovali dva páry lysinových (Lys) zbytků CKM, které se podílejí na její specifické vazbě do M-linie. První pár Lys zbytků (K8 a K24) byl lokalizován na malé doméně CKM a vykazoval slabé interakce s myomezímem i s M-proteinem, zatímco silné interakce byly prokázány u páru Lys zbytků K104 a K115, který je lokalizovaný na velké doméně¹³⁵. Jako model pro studium vazby CKM v M-linii sarkomery jsme použili izolované myofibrily z rychlého svalu m. psoas králíka a ověřili jejich schopnost kontrakce a přítomnost CK aktivity (Příloha 4). Interakci fluorescenčně značené exogenní CKM pomocí iodacetamidfluoresceinu (CKM-IAF) s izolovanými myofibrilami jsme sledovali pomocí konfokální mikroskopie při fyziologickém pH v úzkém rozmezí 7,1-7,15 (Obr. 3a). Kvantifikovali jsme dynamiku CKM-IAF mezi myofibrilami a okolím u samotné CKM-IAF, dále v přítomnosti jednoho substrátu (kreatinu) a v přítomnosti dvou vhodných substrátů (kreatinu a ATP) s použitím metody FLIP (*Fluorescence Lost In Photobleaching*). Okolí sledovaného místa M-linie bylo exponováno vysoké intenzitě laseru a pohyb molekul CKM-IAF mezi myofibrilou a systematicky vybělovaným okolím byl pozorován jako pokles fluorescence v M-linii sarkomery. Jako kontrolu vybělení jsme použili stejný fluorofor konjugovaný s phalloidinem (Phall-FITC), který se specificky a v daném čase ireverzibilně váže na aktinová filamenta, tedy v I-pruhu sarkomery. Naměřené rychlostní konstanty poklesu intenzity fluorescence v M-linii, normalizované k rychlosti vybělení FITC, ukázaly dynamiku výměny CKM v M-linii, což je převrácená hodnota síly vazby. Zjistili jsme, že vazba substrátů CKM významně zpomaluje výměnu CK-IAF v M-linii v pořadí CKM-samotná, CKM-ATP a CKM-ATP-kreatin, což potvrzuje silnější vazbu CKM do M-linie v přítomnosti substrátů (Příloha 4), (Obr. 3b). Tato naměřená data byla v souladu s naší pozdější studií konformačních změn myofibrilární CKM, ve které jsme použili stejné kombinace substrátů (Příloha 5). Konformační změny jsme měřili pomocí rotačních korelačních časů dohasínání vnitřní fluorescence tryptofanových zbytků purifikované myofibrilární CK pomocí fluorescenční spektroskopie s časovým rozlišením. Výsledky ukázaly, že molekula CK bez substrátů (rotační korelační časy 2,72 ns; 35 ns) odpovídá relaxovanému stavu a tedy „otevřené, nereaktivní konformaci“. Po vazbě ATP dochází k „uzavřené reaktivní konformaci“, čemuž nasvědčují nejkratší rotační korelační časy (2,38 ns; 27 ns), avšak molekula částečně relaxuje

po vazbě obou substrátů (ATP a kreatin), kdy dosáhla střední hodnoty rotačního korelačního času 2,42 a 29 ns. V tomto případě zaujímá molekula CK „polouzavřenou nereaktivní konformaci“, což svědčí pro další nezbytnou interakci nebo postranlační modifikaci, která by změnila konformaci CKM do uzavřené a plně reaktivní. Uvedené výsledky jsme též potvrdily pomocí měření anizotropie na exogenní CK značené pomocí fluoresceinizothiokyanátu (CK-FITC), která ukázala závislost rotačního korelačního času na vazbě substrátů: 34 ns pro CK-volná, 27 ns pro CK-ATP a 30 ns pro CK-ATP-kreatin (**Příloha 5**). Tyto naše experimenty ověřily existenci tří konformačních stavů molekuly CK získaných pomocí 3D modelování, které byly již dříve popsány na principu ustavení minimálního energetického stavu v závislosti na vazbě substrátů^{131,132,136}. Naše naměřená data jsou též v souladu s měřením konformačních změn molekuly CK pomocí metody FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), kdy autoři Gregor et al. (2003)¹³⁶ využili vnějšího fluorescenčního značení pomocí IAF a komerčně dostupné CKM.



Obrázek 3a: Interakce kreatinkinázy M (CKM) s myofibrilami. Ilustrační obrázek vazebného experimentu exogenní CKM do M-linie sarkomery (A-C). Vizualizace I-pruhu izolovaných myofibril pomocí konjugátu phalloidinu s fluroforem Alexa 633 (A). Vazebný experiment s přidavkem exogenní CKM konjugované s iodacetaamidfluoresceinem (CKM-IAF; B). Potvrzení vazby CKM v M-linii sarkomery kolokalizací červeného a zeleného signálu (C)

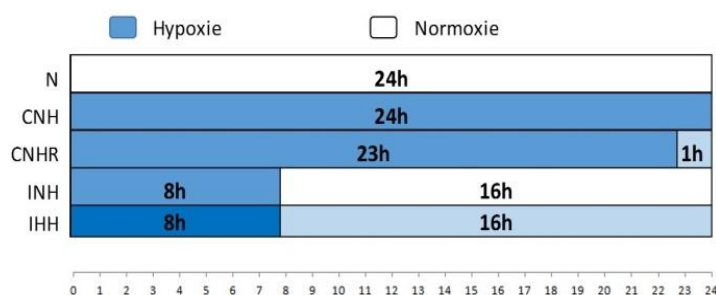


Obrázek 3b: Časový průběh interakce CKM s M-linií sarkomery (D,E).. Pokles fluorescenčního signálu v M-liniích myofibril inkubovaných se substáry CK, které reprezentují pohyb CK-IAF molekul kvantifikovaný pomocí metody FLIP (Fluorescence Lost in Photobleaching). Zobrazené hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. ($n = 6$, počet izolací myofibril): CK-IAF samotná (\circ), ATP-Creatine pár (\blacktriangle), CK-IAF-ATP (\diamond), CK-IAF-fosfokreatin (\blacktriangledown) (Žurmanová et al. 2007; Příloha 7).

Uvedené studie byly v té době ve svém metodickém přístupu poměrně unikátní a doplnily představu o vazbě CKM v M-linii. Ukázali jsme, že vazba CKM je dynamická, závisí na konformačním stavu CK molekuly, který je ovlivněn dostupností substrátů a pH okolí. Přírozené uvolňování CKM z M-linie je v souladu s již známou degradací CKM proteazomem¹³⁷. Naopak chronické okyselení svalů, ke kterému dochází např. v myopatických stavech^{138,139}, by mohlo vést k omezení dynamiky CK v M-linii sarkomery a snížit tak možnost regenerace enzymu v této oblasti. Identifikovali jsme pomocí 2D SDS-elektroforézy tři populace CKM izolované z myofibril, které se lišily v izoelektrických bodech (7,17, 7,28 a 7,47)⁸. Tato heterogenita otevřela další otázky v souvislosti se známou asymetrií podjednotek CKM dimeru, nebo posttranslačními modifikacemi, mezi které patří fosforylace, autotofosforylace¹⁴⁰, nukleotidylace, sumoylace a další a jejich případný vliv na vazbu CKM v M-linii sarkomery.

5. KARDIOPROTEKTIVNÍ FENOTYP SRDCE ADAPTOVANÉHO NA CHRONICKOU HYPOXII

Adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje odolnost srdce k ischemicko-reperfúznímu poškození (I/R) a je využívána pro studium mechanismů působení hypoxie na myokard a mechanismů endogenní kardioprotekce na Oddělení vývojové kardiologie FGÚ AV ČR již více než 50 let^{141,142}. V rámci spolupráce s tímto pracovištěm, která byla podporovaná pěti grantovými projekty, jsme sledovali několik kardioprotektivních modelů chronické hypoxie. Ve studiích jsme použili kontinuální normobarickou hypoxii (CNH, 24h/den, 0,1 pO₂, 3 týdny) a intermitentní normobarickou hypoxii (INH, 8h/den, 0,1 pO₂, 3 týdny), a dále režim intermitentní hypobarické hypoxie (IHH, 8h/den, 7000 m.n.m., 5 týdnů)^{143–145} (**Přílohy 9-13, 15-17**; Obr. 4). Kromě toho jsme také použili model intermitentní normobarické hypoxie (CNH-R, 23h/den + 1h reoxygenace), který se ukázal jako neprotektivní a naopak odolnost k I/R zhoršoval¹⁴⁶. Po CNH adaptaci následoval krátký ischemický inzult s reperfúzí (**Příloha 11**). Je třeba zmínit, že režimy mírné normobarické hypoxie (CNH, INH a CNH-R) nezpůsobují hypertrofii levé komory, a pozorujeme zde tedy čistý vliv hypoxie (**Příloha 15**). Naopak extrémní IHH vyvolává hypertrofii levé komory zhruba o 11 %¹⁴⁷ (**Příloha 10**), což mírně komplikuje situaci a musíme uvažovat současný vliv hypoxie i následné hypertrofie. Proto v současnosti sledujeme CK a HK systém též u kmene potkanů se spontánním rozvojem hypertenze (SHR) a tedy levostranné hypertrofie, který by měl odlišit vliv samotné hypoxie a vliv tlakového přetížení. Rozvoj hypertrofie u mladých dospělých SHR potkanů by měl odpovídat zvířatům po pětítýdenní adaptaci na IHH s reverzibilní hypertrofií¹⁴⁸. Naproti tomu potkani SHR staří jeden rok a více jsou modelem pro nevratné změny v levé komoře myokardu vyvolané hypertrofií vedoucí postupně k srdečnímu selhání^{149,150}.



Obrázek 4. Časové schéma použitých režimů adaptace na normobarickou hypoxii kontinuálně 24 hodin denně (CNH) a s jednohodinovou reoxygenací denně (CNH-R). Intermitentní režimy 8 hodin denně hypoxie byly použity u normobarické hypoxie (INH) a hypobarické hypoxie 7 000 m (IHH). (Upraveno podle D. Kašparové)

5.1. Kreatinkinázový systém v hypoxii

Adaptace na hypoxii vyvolává v organismu celou řadu změn, které vedou na jedné straně ke zvýšené transportní kapacitě kyslíku do tkání a na straně druhé k přizpůsobení buněčného metabolismu na jeho sníženou dostupnost^{9,141,142,151}. Bylo zjištěno, že tyto adaptivní změny jsou jak na úrovni celého organismu, tak na úrovni kardiomyocytů řízeny aktivací hypoxií indukovaného faktoru HIF^{152–155}. Nedávno bylo zjištěno, že exprese izoform CK je mimo jiné také regulována signální drahou HIF¹⁵⁶ a suplementace kreatinem zvyšuje aktivitu tohoto transkripčního faktoru¹⁵⁷. To je dalším dokladem širokého působení tohoto transkripčního faktoru v adaptabilitě energetického metabolismu, která napomáhá organismu přizpůsobit se podmínkám snížené dostupnosti energie oxidativní fosforylací a získat energetické zdroje na překonání období nedostatku kyslíku. Posílení tohoto endogenního mechanismu se objevuje jako všeobecně prospěšné, spojené se snížením rozsahu I/R poškození. Jak již bylo řečeno, izoformy CK jsou vysoce kompartmentalizovány a lokalizovány v blízkosti ATPáz tak, aby udržovaly optimální podmínky pro jejich aktivitu. Jejich delokalizace může být příčinou snížené funkce CK systému i při zachování hladiny proteinů nebo enzymatické aktivity v buňce. Proto bylo cílem naší práce sledovat celkovou aktivitu CK systému, expresi cytosolických izoform CKM a CKB a změny jejich lokalizace v průběhu hypoxie, krátkodobé ischemie a reperfúze a v průběhu rozvoje hypertrofie. Ke splnění těchto cílů jsme použili metody Real Time RT-PCR, western blot pro stanovení exprese, kvantitativní imunofluorescenční metody pro určení lokalizace proteinů a jejich změn spolu se spektrofotometrickými metodami ke stanovení specifických enzymatických aktivit.

5.1.1. *Expese a aktivita izoform kreatinkinázy*

Celkovou kapacitu CK systému získáme měřením specifické enzymatické aktivity, která zahrnuje veškeré izoformy a může zohlednit dílčí kompartmenty, v případě, že ji budeme měřit v daných subcelulárních frakcích. Při práci se vzorky svalové tkáně je potřeba si uvědomit, že vytvoření postnukleárního supernatantu nás též zbavuje myofibril a většiny organel, které uvíznou mezi nimi včetně asociovaných enzymů. Proto jsme měřili aktivitu buď v homogenátu, abychom postihli buňku jako celek anebo v mitochondriální frakci, která byla cílem našeho zájmu. Naše měření ukázala, že všechny režimy normobarické adaptace CNH, INH i CNH-R zvyšují celkovou aktivitu CK systému, avšak liší se míra exprese jednotlivých

izoforem po adaptaci i mezi levou a pravou komorou (**Příloha 9**). Stejně tak významně roste aktivita CK po extrémní IHH u obou komor (**Příloha 10**).

Na úrovni exprese proteinu, jsme nepozorovali žádné rozdíly u cytosolické CKM ani v levé ani v pravé komoře po CNH, zatímco protein CKB po hypoxii v obou komorách velmi významně vzrostl. Intermittentní režim extrémní hypoxie IHH vyvolal nárůst fetální izoformy CKB v obou komorách zhruba o 150-200 %, což je srovnatelné s CNH (**Přílohy 9 a 10**). Exprese mitochondriální mtCKs vzrostla srovnatelně s CKB po CNH avšak po IHH jsme pozorovali její pokles v mitochondriální frakci v obou komorách. V pravé komoře byl pokles ještě větší, přestože celková aktivita rostla (Kolar D. et al. v přípravě).

Nezaznamenali jsme změnu celkového objemu mitochondrií ani změnu exprese ATP syntázy v homogenátu po IHH (Dizertační práce P. Wasková 2014, **Příloha 10**). Nicméně, u téhož modelu byl zjištěn mírný signifikantní pokles kardiolipinu v mitochondriích, se kterým mtCKs interaguje^{151,158}; a tato skutečnost je v souladu s námi pozorovaným poklesem mtCKs. Na stejném modelu bylo ukázáno, že v průběhu adaptace dochází k buněčné selekci s významným poklesem mitochondrií^{159,160}. Zjistili jsme vyšší expresi a fosforylaci AMPK v pravé komoře ve srovnání s levou, a překvapivě tento rozdíl vliv IHH eliminoval. Tento překvapivý výsledek vyžaduje studium dalších souvislostí (D. Kolář, nepublikované výsledky).

Pozorované odlišné exprese izoforem CKM a CKB jsou v souladu s rozdílnými transkripčními faktory těchto izoforem. Exprese CKM se významně zvyšuje po narození a souvisí s transkripčními faktory, které jsou spojeny s maturací svalových tkání. Jedná se o MyoD¹⁶¹ a Myf5 u kosterního svalu a Mef2 u srdce^{162,163}. Tyto transkripční faktory působí v součinnosti s dalšími, jako je např. Six4 a p53¹⁶⁴. Zajímavé je, že stimulace CKM současně tlumí expresi CKB. Naopak exprese CKB probíhá u zralého srdce velmi pružně v závislosti na okolních podmínkách. Byla prokázána její stimulace při zvýšení β -adrenergní signalizace v souvislosti s AP2 nebo v souvislosti se signální dráhou estrogenového receptoru spolu se specifickým proteinem 1 (Sp1)^{122,165-168}. Podobně HIF stojí za aktivaci CKB a mnoha dalších genů při mechanickém přetížení srdce i svalů anebo po vystavení přímé hypoxii¹⁵⁶. Při stresových situacích, jako je hypoxie, ischemie, hypertrofie atd. byl ukázán nárůst CKB a současný pokles CKM^{63,169-171}. Z výše uvedeného je zřejmé, že tyto dvě izoformy vykazují inverzní regulaci. Naše výsledky ukazují, že k mírnému potlačení hladiny proteinu CKM dochází až u extrémní IHH v pravé komoře, zatímco CNH ji neovlivnila, přestože CKB velmi citlivě reaguje již na mírnou hypoxii (shrnutí v Dizertační práci Wasková 2014).

5.1.2. Lokalizace izoforem kreatinkinázy v M-linii sarkomery

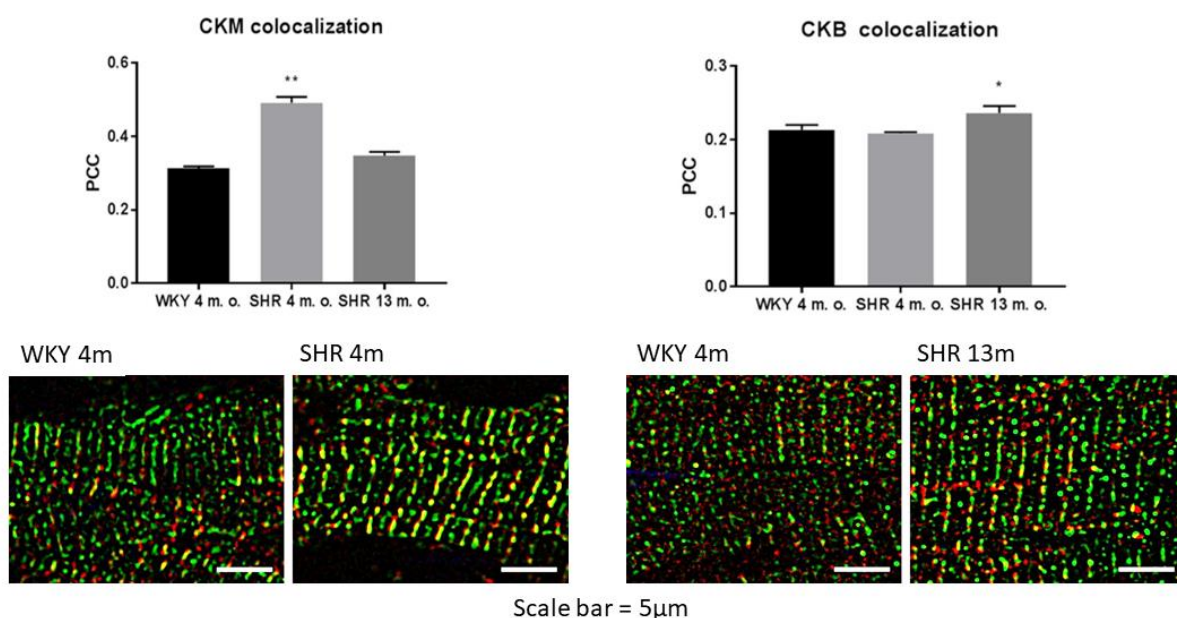
Součástí diplomové práce M. Heleše (2017) je unikátní nález lokalizace CKB izoformy v oblasti M-linie sarkomery, kterou stanovil pomocí kvantitativní imunofluorescence dvěma přístupy, buď kolokalizací izoforem CK značených Alexa 647 s myomezínem značeným Alexa 488 u SHR a Wistar a Wistar Kyoto (WKY) potkanů a nebo kolokalizací CK izoforem s inverzním signálem aktinových filament značených konjugátem Phalloidin-Alexa647. Kolokalizaci jsme vyjádřili pomocí Pearsonova korelačního koeficientu (PCC), vypočteného pomocí ICA pluginu (*image correlation analysis*) v rámci veřejně dostupného programu FIJI pro obrazovou analýzu¹⁷².

Uvažujeme-li lokalizaci CKB v M-linii sarkomery, která nemá N-terminální sekvenci nezbytnou pro vazbu do M-linie jako CKM izoforma¹³⁵, nabízí se přítomnost CKB ve formě heterodimeru CKMB, kdy CKM by mohla plnit vazebnou úlohu a CKB katalytickou roli. Specifická funkce heterodimeru dosud v literatuře nebyla popsána a jeví se nám jako smysluplná kompenzace při zatížení srdce hypertrofií, hypoxií či ischemií, kdy vzrůstá jeho přítomnost¹⁷³ (**Příloha 9**). U hypertrofovaného srdce pod vlivem adaptace na extrémní IHH jsme zjistili, že v levé komoře, vystavené krátké ischemii, dochází k disociaci obou cytosolických izoforem (CKB a CKM) z M-linie sarkomery a v reperfúzi se navrácí k původnímu stavu (Diplomová práce, M. Heleš 2017). Usuzujeme, že tento jev by mohl být součástí remodelace levé komory vlivem hypertrofie, která je spojená se změnou exprese myofibrilárních proteinů v M-linii, zvláště myomezínu¹⁷⁴. Dislokace CKM může mít hypoteticky protektivní charakter, neboť vyřazení *substrate channelingu* mezi CK v M-linii sarkomery a myozínovou ATPázou se všemi důsledky, může v ischemii významně snížit aktivitu myozínových ATPáz a zpomalit tak vyčerpání energetických zásob. Jak bylo řečeno izoforma CKB byla dříve považována za zcela solubilní¹³⁵, avšak v poslední době se objevily informace o interakcích CKB s membránovými strukturami¹⁷⁵. Zbývá tedy odhalit, zda má samotná CKB vazebnou doménu anebo zda se v případě asociace se subcelulárními strukturami skutečně vyskytuje ve formě CKMB dimeru.

U mladých hypertenzních potkanů (SHR, 4 měsíce) jsme zjistili, že je asociace CKM v M-linii významně vyšší o 57 %. (PCC = 0,5) ve srovnání s kontrolou WKY (PCC = 0,3). Naproti tomu u starých 13-ti měsíčních SHR toto zvýšení CKM vymizelo (PCC = 0,35), avšak zde jsme pozorovali mírné signifikantní zvýšení asociace CKB v M-linii (Obr. 5). Výsledky u dvouletých SHR, které mají selhávající srdce, nemáme zatím zpracované. Zdá se, že v dobře

kompensovaném stavu se zvyšuje CKM v M-linii a u dekompenzované hypertrofie CKM klesá a částečně ji nahrazuje CKB.

Minoritní izoforma CKB představuje v srdci určitou zálohu CK systému pro „horší časy“ a její významnou vlastností je zvýšená afinita k PCr¹⁷⁶, která posiluje funkci CK systému mezi mitochondriemi a cytosolem i za sníženého energetického stavu. Dále bylo zjištěno, že CKB je více odolná k oxidativnímu stresu a je pozitivně regulována PKC, zatímco CKM je negativně regulována PKC a na oxidativní stres je velmi citlivá^{177–180}. Tyto údaje jsou v souladu se zvýšenou expresí PKC po extrémní IHH i mírné CNH¹⁸¹ avšak u SHR potkanů ve srovnání s kontrolními WKY je nižší exprese PKC (**Příloha 13**).



Obrázek 5. Kolokalizace cytosolických izoform CK (červeně; vlevo) a CKB (červeně; vpravo) v M-linii sarkomery s myomesinem (zelený) u spontánně hypertenzních potkanů SHR a normotenzních Wistar Kyoto (WKY) v průběhu stárnutí v obdobích 4 (SHR 4m.o.) a 13 měsíců věku (SHR 13 m.o.). Zvýšená kolokalizace kreatinkinázy a myomesinu je zobrazena žlutou barvou. (Diplomová práce M. Heleš 2017, úprava obrázků B. Elsnicová).

5.2. Úloha HIF/Akt/HK v kardioprotektivním fenotypu adaptace na hypoxii

Dalším cílem naší laboratoře bylo studovat protektivní dráhu hypoxií indukovaného faktoru (HIF)/proteinkinázy B (Akt)/HK2 a ukázat její možný podíl na kardioprotektivním fenotypu vyvolaném chronickou hypoxií. Vzhledem k našemu dlouhodobému zájmu jsme sledovali také změny v mitochondriální mtCKs a případnou souvislost s funkcí izoform HK lokalizovaných v oblasti mitochondrií, neboť tyto dva enzymy se nacházejí ve velké blízkosti a asociují na protilehlých stranách VDAC. Jejich aktivita má v principu stejný vliv na mitochondriální respiraci a tak je otázka, zda a jak je řízena jejich kooperace.

5.2.1. Adaptace na hypoxii a hypoxií indukovaný faktor HIF

Adaptivní změny jsou jak na úrovni celého organismu, tak na úrovni kardiomyocytů řízeny aktivitou HIF^{152–155}. Transkripční faktor HIF je aktivní ve formě heterodimeru α a β podjednotky. Zatímco β -podjednotka je konstitutivně přítomná, α -podjednotka je regulována hladinou kyslíku, tak že v přítomnosti kyslíku je degradována působením prolylhydroxyláz (PHD). Zvýšená aktivita HIF je pro vývoj a integritu srdce v hypoxické zátěži nezbytná. Na druhé straně je zřejmé, že pokud by po vystavení organismu hypoxii docházelo k chronické aktivaci HIF, následky by byly detrimentální^{182,183}. Z tohoto pohledu je přijatelné, že aktivita HIF v chronicky hypoxických podmínkách nemusí být vždy zvýšena a že dochází k jeho obousměrné regulaci. Vzhledem k tomu, že i další kardioprotektivní intervence, jako je fyzická zátěž a ischemický preconditioning, aktivují signální dráhy společné s adaptací na hypoxii včetně signální dráhy HIF^{184–189}, nelze vyloučit, že jejich protektivní efekt je založen na podobných principech a je možné, že i z tohoto důvodu nebyl shledán aditivní kardioprotektivní efekt u fyzické zátěže v hypoxii¹⁹⁰.

V srdci se nachází dvě dominantní izoformy HIF1 α a 2 α , a minoritní izoforma HIF3 α . Aktivace HIF1 α se opakovaně ukázala jako kardioprotektivní^{151,191–195} (**Příloha 15**), nicméně rozdíl v působení HIF1 a HIF2 v srdci není dosud zcela jasný a jejich dysregulace zmůže mít detrimentální účinky¹⁹⁶. Bylo ukázáno, že HIF1 je zodpovědný v srdci za vaskularizaci a je výrazně zvýšen po ischemii na rozhraní nekrotické a viabilní tkáně, naproti tomu HIF2 je zvýšen v okolní tkáni¹⁸³.

Mezi pozitivní regulátory transkripční aktivity HIF patří HSP90 (heat shock 90 kD protein), p300 (histone acetyltransferase P300), Ref1 (redox factor-1), Jab1 (COP9 signalosome complex subunit 5) a TIF2 (transcriptional intermediary factor 2)¹⁹⁷; dále růstové

faktory stimulující PI3K/Akt a ERK dráhy, a další cílové proteiny signální dráhy Akt včetně mírného oxidativního stresu^{198,199}. Mezi přímé inhibitory HIF1 α patří tři izoformy PHD (PHD1-3) aktivované kyslíkem, které umožňují jeho interakci s von Hippel Lindau proteinem pVHL a následnou degradaci proteazomem^{200,201}. U protektivních režimů mírné hypoxie CNH a INH, jsme nenašli významné změny v expresi izoforem PHD (**Příloha 15**). Dále HIF může být inhibován asparaginyhydroxylázou (FIH1AN), která je nezávislá na kyslíku a nevede k jeho degradaci²⁰². FIH1AN vyvolává pouze částečnou inhibici transkripční aktivity u obou izoforem HIF1 α a HIF2 α hydroxylací asparaginu v C-terminální transaktivační doméně (C-TAD). Tato částečná inhibice pravděpodobně vede k selektivní aktivaci cílových genů izoforem HIF^{203,204}. S použitím korelační analýzy jsme zjistili vyšší korelaci hladin mRNA mezi FIH1AN a HIF2 α než mezi FIH1AN a HIF1 α po adaptaci na protektivní režimy mírné hypoxie, což naznačuje možný význam tohoto funkčního spojení v kardioprotekci (**Příloha 15**). Vedle výše uvedených inhibitorů existuje celá řada dalších, které jsou většinou založené na protein-proteinových interakcích jako je např. CITED (Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain) a FOXO (Forkhead box O)^{205,206}.

5.2.2. *Izoformy HIF v hypoxickém a hypertrofovaném srdci u kmenů Wistar a SHR*

V naší práci jsme ukázali rozdíly v aktivaci izoforem HIF po adaptaci na různé režimy chronické hypoxie. Na úrovni mRNA se HIF1 α po CNH neměnil, zatímco HIF2 α se významně zvýšil až o 100 % jak po CNH, tak i po INH. Naproti tomu extrémní IHH neukázala signifikantní změny v mRNA hladinách HIF izoforem. Tyto výsledky ukazují na důležitý vliv intenzity chronické hypoxie v průběhu adaptace v obou protektivních režimech¹⁹⁵ (Kašparová et al., v přípravě). U hypertenzního kmene SHR jsme po adaptaci na CNH pozorovali významné zvýšení mRNA HIF1 α , zatímco mRNA HIF2 α poklesla (**Příloha 13**).

Tyto naše výsledky přinášejí zajímavé srovnání, ze kterého vyplývá, že dochází výhradně k aktivaci HIF2 α u normotenzních potkanů po CNH, kde působí samotná mírná hypoxie a nikoliv hypertrofické mechanismy. Naproti tomu ke zvýšení HIF1 α dochází u mladých SHR (4 měsíce) po CNH, kde již před vystavením hypoxii byly aktivovány signální dráhy související s rozvojem hypertrofie, a následná CNH je tedy ještě podpořila. Toto je též v souladu se signifikantně vyšší aktivací HIF1 α u konplastického kmene SHRmt-BN, který nese jadernou DNA z kmene SHR a mitochondriální DNA z normotenzního kmene Brown Norway, kdy SHRmt-BN vykazuje vyšší stupeň hypertrofie než SHR (**Příloha 12**). Navíc zde

u obou kmenů došlo k výraznému potlačení HIF2 α , což by mohlo naznačovat inverzní regulaci izoforem za těchto podmínek (**Příloha 13**). U IHH se jedná o kombinaci extrémní hypoxie a výrazné hypertrofie, které se rozvíjely současně, a v tomto případě rostoucí hladiny mRNA izoforem HIF nedosáhly signifikantního zvýšení. Loboda et al. dokládají protichůdný vliv izoforem HIF1 α a HIF2 α na aktivaci transkripčního faktoru pro antioxidanty Nrf2 a cytokin IL-8, kdy HIF1 α působí tlumivě a HIF2 α stimuluje jejich expresi skrze SP-1. Shodný účinek izoforem autoři pozorovali na vaskularizaci²⁰⁷. To je částečně v souladu s našimi výsledky, kdy CNH stimuluje expresi HIF2 α a Nrf2 (**Příloha 15**), zatímco v extrémní IHH, kde se exprese HIF nezměnila, Nrf2 klesl (Kašparová et al. v přípravě).

Aktivace HIF významně přispívá ke zvýšené dodávce kyslíku do tkání²⁰⁸. Spolu s tím HIF udržuje rovnováhu buněčného energetického metabolismu mezi aerobní a anaerobní glykolýzou ovlivněním metabolismu na více úrovních. Podílí se na významném posílení glykolytického metabolismu, které bylo opakovaně potvrzeno jako kardioprotektivní^{209,187,210}. Současně, za přiměřené hypoxie HIF stimuluje mitochondriální biogenezi aktivací Akt/eNOS signální dráhy²¹¹, avšak extrémní hypoxie vede spíše k potlačení těchto dějů v kosterním svalu i v srdci^{160,212}. My jsme po adaptaci na IHH nezjistili žádné změny v expresi proteinů respiračního řetězce ani v objemu mitochondrií v levých komorách u potkanů (**Příloha 10**, Elsnicová nepublikovaná data), avšak na úrovni respirace a aktivity mitochondriálních enzymů pozorujeme pokles (Kolář D et al. nepublikovaná data). Na druhé straně, HIF zasahuje do metabolické aktivity mitochondrií tím, že ovlivňuje aktivitu pyruvát-dehydrogenázykinázy PDK1, která snižuje vstup pyruvátu do mitochondrií^{213,214}. HIF též ovlivňuje využití kyslíku mitochondriemi záměnou izoforem podjednotek cytochromoxidázy COX4.1 za COX4.2²¹⁵, která má ke kyslíku vyšší afinitu a tím zvyšuje aktivitu komplexu IV v hypoxii. Pokles COX4.1 jsme pozorovali u kmene SHR po CNH (**Příloha 12**). Naše výsledky též potvrzují zvýšení exprese proteinů HK2 a Glut4 po CNH u SHR (**Příloha 13**), které patří k přímým cílovým genům HIF^{9,151,216}. Výše uvedené změny, které modulují mitochondriální metabolismus, se významně podílejí na snížené produkci ROS v hypoxických podmínkách.

Pro naše práce je významné, že HIF stimuluje expresi HK2 a současně může být zpětnovazebně regulován signální dráhou Akt^{199,217}. Není vyloučeno, že samotná Akt je též zodpovědná za transkripci HK2²¹⁸. Zvláštní význam signální dráhy Akt v hypoxii zdůrazňuje skutečnost, že některé proteiny regulované touto dráhou mohou být pozitivními a jiné negativními regulátory HIF. Zatímco HDM2 (*P53-binding protein mdm2*) a mTOR (*mammalian target of rapamycin*) zvyšují expresi HIF, GSK3 β (*glycogen synthase kinase β*) a FOXO4 jej regulují negativně. Významnou roli zde hraje trvání hypoxie, neboť akutní expozice

mají tendenci aktivitu HIF zvyšovat a chronické tlumit. Z našich zkušeností v srdci hraje ještě úlohu intenzita a režim hypoxie (**Příloha 15** a Kašparová et al. v přípravě).

5.2.3. Protein kináza B (Akt) v srdci

V souvislosti s HIF byla stimulace signální dráhy Akt mnohokrát prokázána jako kardioprotektivní^{187,209,219}. Akt přináší mnoho benefičních účinků, avšak je známo, že její chronická aktivace, se kterou se setkáváme např. v selhávajícím srdci, může mít detrimetální účinky²²⁰⁻²²¹. Protektivní účinky jsou spojené s posílením metabolismu glukózy, proliferací a přežitím kardiomyocytů i srdečních progenitorových buněk²²²⁻²²⁵. Akt též stimuluje uvolňování vápníku z kanálů CaL a Ryr stejně jako aktivitu SERCA, a tím významně zasahuje do homeostázy a obratu Ca²⁺ iontů v kardiomyocytech^{226,227}. V neposlední řadě Akt hraje významnou úlohu v ochraně mitochondrií a modulaci jejich morfologie^{228,229}.

Je známo, že signální dráha Akt je aktivována přes fosfatidylinozitol-3-kinázu (PI3K), která je stimulována různými extracelulárními podněty po aktivaci mnoha typů receptorů. Jedním z nich je inzulínový receptor. Existují tři izoformy Akt: Akt1, Akt2 a Akt3²³⁰, z nichž první dvě jsou v srdci dominantní. Naše výsledky ukázaly, že v levé komoře potkanů Wistar je hladina Akt3 na úrovni mRNA až o řád nižší, než jsou hladiny Akt1 a Akt2 (Kašparová D., nepublikovaná data).

Významný pokrok při studiu funkce dominantních izoform Akt v srdci přinesly transgenické modely myši, u kterých útlum nebo jejich nadměrná exprese vedla buď k ovlivnění metabolismu anebo hmotnosti srdce²³¹. Akt1 je spojována s kardioprotektivními signálními drahami^{232,233} a její nadměrná exprese vedla v srdci k hypertrofii, včetně zvýšené fibrózy, avšak nenarušila funkci srdce. V souladu s tím deficience Akt1 způsobila sníženou hmotnost srdce zhruba o 20 % při zachování normálního metabolismu. Naproti tomu Akt2 deficientní myši měly narušený inzulínem stimulovaný příjem glukózy²³⁴. Tímto autoři potvrdili úlohu Akt1 v hypertrofickém růstu, zatímco úlohu Akt2 zde vyloučili. V současné době se používají Akt2 deficientní myši jako model inzulínové rezistence²³⁵. Minoritní izoforma Akt3 je též spojována s kardioprotekcí i hypertrofickým růstem podobně jako Akt1.

Regulace aktivity Akt byla nejvíce studována na úrovni fosforylace. Akt má mnoho fosforylačních míst, avšak pro plnou aktivaci jsou klíčová dvě místa, která jsou lokalizovaná na threoniovém zbytku Thr³⁰⁸ nebo Thr³⁰⁹ a serinovém zbytku Ser⁴⁷³ nebo Ser⁴⁷⁴ pro Akt1 a Akt2 v uvedeném pořadí. Fosforylace Thr zbytku v T-smyčce je zajišťována pomocí fosfoinozimid-dependentní kinázy (PK1) a defosforylace zde probíhá pomocí proteinfosfatázy

(PP2A). Klíčová fosforylace na Ser zbytku v oblasti C-terminálního hydrofóbního motivu vede k plné aktivaci Akt a je zprostředkována pomocí mTOR komplexu 2 (mTORC2)^{226,236}. Její defosforylace je zajišťována pomocí plekstrin homologní domény PHLPP fosfatáz²³⁷ a k degradaci dochází pomocí ubiquitinylace²³⁸.

Naše výsledky, získané pomocí western blotů, ukázaly vyšší aktivaci celkové Akt v pravé komoře u normoxických potkanů na úrovni fosforylačního poměru $p_{\text{Thr}}\text{Akt}/\text{Akt}$ i $p_{\text{Ser}}\text{Akt}/\text{Akt}$ (**Příloha 8**). Nedávno jsme ukázali, že po desetiminutové globální ischemii se fosforylace celkové Akt na Ser⁴⁷³ v levé komoře zvýšila u normoxických potkanů, ale nezvýšila se její fosforylace na Thr⁴⁰⁸. Po adaptaci na CNH a následné globální ischemii byla fosforylace ještě vyšší (**Příloha 11**). Toto naše zjištění je v souladu s novou představou získanou na buněčných modelech, která ukazuje, že fosforylace na Ser a Thr zbytcích jsou na sobě nezávislé děje a regulují afinitu Akt ke specifickým substrátům^{239–243}. Na základě těchto poznatků můžeme říci, že aktivita Akt v protektivním fenotypu CNH hraje významnou úlohu v krátkodobé ischemii a je pozitivně modulována pouze na úrovni fosforylace Ser⁴⁷³. Dále jsme zjistili, že extrémní hypoxie IHH zvýšila expresi Akt1 i Akt2 v levé komoře, zatímco v pravé komoře byla již vyšší v normoxii a dále se nezměnila (D. Horníková, nepublikované výsledky). V souladu s tím jsou předchozí data Ravingerové et al, kde byla zjištěna její významná role v ischemickém preconditioningu, avšak u adaptace na IHH nebyla zjištěna přímá souvislost Akt dráhy a kardiprotekce^{244,245}.

Zvýšenou expresi Akt2 po CNH jsme pozorovali též u konplastického kmene SHRmtBN, který má vyšší odolnost k I/R poškození než původní kmen SHR. To může ukazovat na její důležitou úlohu v kardioprotekci a zvýšené odolnosti mitochondrií vápníkovému přetížení (**Příloha 12 a 13**). Bylo ukázáno, že Akt2 se mimo jiné se může podílet i na modulaci dynamiky mitochondriálního retikula spolu s mitofuziny²²⁹.

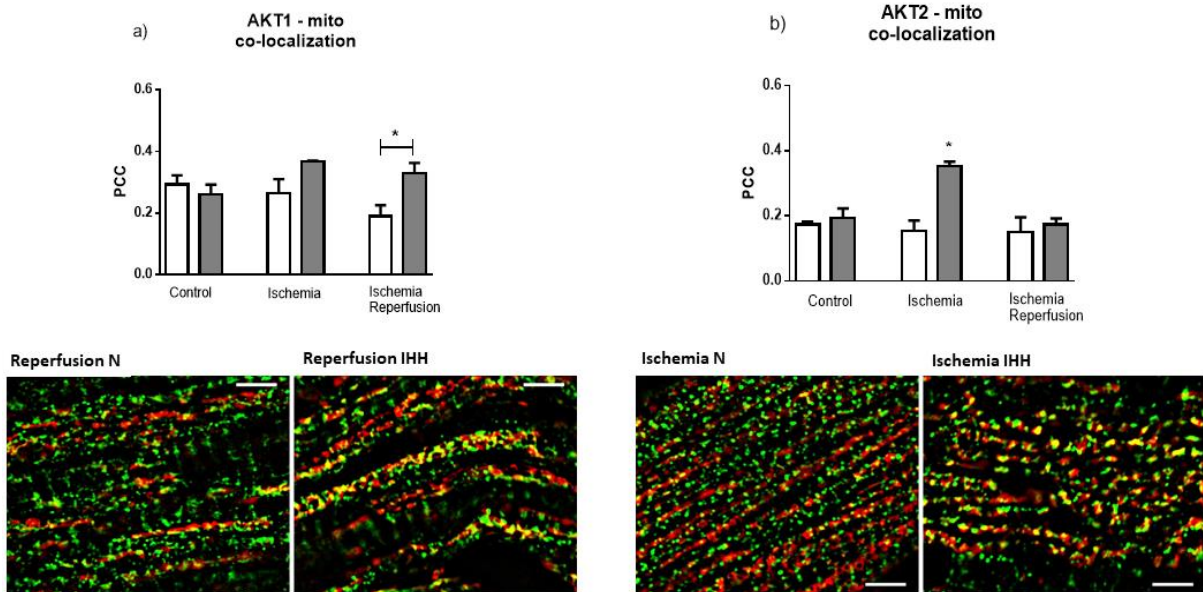
5.2.4. Lokalizace izoforem Akt v kardiomyocytech

Lokalizace Akt izoforem v jednotlivých kompartmentech buňky je klíčová pro plnění jejich specifické funkce²⁴⁶. Pro interpretaci našich výsledků je důležité, že zvýšená aktivita Akt vede k fosforylaci HK2 na Thr³⁰⁸, která je spojena s translokací HK2 z cytosolu na vnější mitochondriální membránu. Je známo, že vazba HK2 na VDAC snižuje pravděpodobnost aktivace apoptózy^{228,247} a aktivovaná Akt snižuje vliv pro-apoptotických proteinů Bax a Bad v oblasti mitochondrií, což současně posiluje funkci anti-apoptotických proteinů rodiny Bcl2. Tímto signální dráha Akt chrání kardiomyocyty před aktivací apoptózy mitochondriální

cestou^{248,249}. Avšak při významném snížení energetického stavu buňky anebo za vysokého stresu, může být aktivována AMPK, která inhibuje PI3K/Akt dráhu²⁵⁰.

Z výše uvedených důvodů jsme sledovali změny lokalizace obou izoform Akt (Akt1 a Akt2) v oblasti mitochondrií a sarkolemy pomocí kvantitativní imunofluorescence na podélných řezech levé komory následujícím způsobem: Kvantifikovali jsme míru kolokalizace fluorescenčních signálů primárních protilátek proti oběma Akt izoformám, sekundární protilátka byla konjugována s Alexou 488, buď s konjugátem wheat germ aglutininu (WGA) s Alexou 647, který je markerem sarkolemy, anebo s komerčně dostupným koktejlem protilátek proti vybraným podjednotkám komplexů respiračního řetězce (anti-OXPPOS), kde sekundární protilátka byla konjugována s Alexa647. Kvantitativní hodnocení bylo provedeno pomocí softwaru FIJI¹⁷². V průběhu krátkodobé globální ischemie a reperfúze na modelu „*ex vivo*“ (Elsnicová et al. nepublikovaná data, Obr. 6) jsme zjistili, že v kontrolní skupině byla Akt1 částečně lokalizovaná jak v mitochondriálním kompartmentu (PCC = 0,3), tak v menší míře v oblasti sarkolemy (PCC = 0,15). Tento nález částečně odpovídá pozorováním na HEK293 buňkách, kde byla Akt1 lokalizována převážně v cytosolu, odkud se může translokovat na vnitřní stranu cytoplazmatické membrány při své aktivaci²²⁹. Vedle toho, byla pozorována translokace Akt1 do jader kardiomyocytů, kde ovlivnila proliferaci kardiomyocytů a homeostázu Ca²⁺ iontů²³⁰. Tuto translokaci jsme však u našich vzorků nepozorovali. U Akt2 jsme zaznamenali kolokalizaci v mitochondriálním kompartmentu, avšak v menší míře než u Akt1 (PCC = 0,2), a její přítomnost v oblasti sarkolemy (PCC < 0) jsme zcela vyloučili. Samotná adaptace na IHH lokalizaci obou izoform neovlivnila, ale v kombinaci s 10 min ischemií došlo k výraznému nárůstu lokalizace Akt1 v mitochondriálním kompartmentu (zhruba o 180 %) a tento nárůst přetrvával i v reperfúzi, což svědčí ve prospěch její protektivní funkce. U Akt2 došlo v IHH skupině po ischemii také k velkému nárůstu v oblasti mitochondrií (zhruba o 150 %), zatímco v reperfúzi odpovídal PCC kontrolní skupině.

To, zda jsou Akt izoformy lokalizovány v oblasti mitochondriální membrány, anebo zda translokují do mitochondriální matrix, nemůžeme na základě našich údajů posoudit i přesto, že tento fenomén je znám²³¹. Dále jsme hodnotili míru kolokalizace Akt izoform s OXPPOS u tří mitochondriálních subpopulací, tj. subsarkolemální, intermyofibrilární a preinukleární, a zjistili jsme, že nejvyšší stupeň kolokalizace je v subsarkolemální oblasti. Tyto naše výsledky naznačují, že IHH zvyšuje možnou protektivní úlohu Akt1 během krátkodobé ischemie i reperfúze, zatímco úloha Akt2 v oblasti mitochondrií je významná zejména v ischemii (Horníková et al. v přípravě).

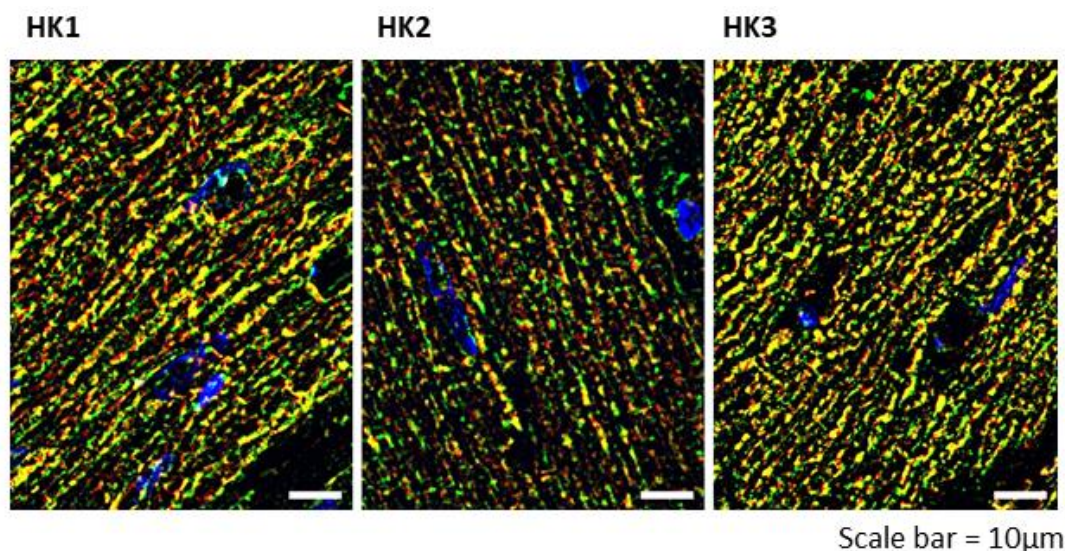


Obrázek 6. Míra kolokalizace proteinkinázy B, AKT1 (a) a AKT2 (b) (zeleně) s mitochondriemi fluorescenčně značenými protilátkou proti OXPHOS komplexům (červeně) v levé komoře srdce potkana byla kvantifikována pomocí Pearsonova korelačního koeficientu (PCC) u kontrolní skupiny (bílé sloupce) a u adaptovaných zvířat na intermitentní hypobarickou hypoxii (šedé sloupce), po krátké ischemii (10 min) a následné reperfúzi. Míra kolokalizace (žlutá) je patrná na obrázcích (dole). (Nepublikované výsledky B. Elsnicová)

Z literatury vyplývá, že se izoformy Akt vzájemně nezastupují, a to přesto, že jsou vysoce homologní. Role Akt2 je zasazena převážně do oblasti energetického metabolismu glukózy a potlačení apoptózy. Její ablace narušila homeostázu mitochondrií a vyvolala autofagii²⁵¹, zatímco zvýšená translokace do mitochondrií potlačila aktivaci apoptotických signálů u kardiomyocytů. Akt2 byla též pozorována v oblasti Golgiho aparátu²⁵². To ovšem nevysvětluje příčné pruhy na našich podélných řezech, které by spíše nasvědčovaly lokalizaci v oblasti sarkoplazmatického retikula či jiných příčně orientovaných struktur v oblasti I-pruhu sarkomery. Naše recentní výsledky naznačují možnou interakci v oblasti membrán asociovaných s mitochondriemi (**Příloha 13**) společně s HK2, která může mít významný protektivní potenciál. Nedávno bylo ukázáno, že funkční sprážením mezi sarkoplazmatickým retikulem a mitochondriemi je významný regulátor homostázy Ca^{2+} iontů a apoptózy³³². V souladu s tím existují nezávislé doklady o pleiotropním účinku Akt2 v regulaci homostázy Ca^{2+} iontů.

5.3. Izoformy hexokinázy v srdci

Hexokináza (HK) se vyskytuje u savců ve všech tkáních a je nezbytná pro vývoj každého jedince i pro jeho další život. Ve většině prací se v srdci uvažují pouze dvě izoformy HK1 a HK2, ale ve skutečnosti je zde konstitutivně exprimovaná též izoforma HK3 a naše výsledky tuto skutečnost dokládají (Obr.7).



Obrázek 7: Reprezentativní obrázek lokalizace izoform hexokinázy (HK1, HK2 a HK3, zeleně) v oblasti mitochondriálního kompartmentu značeného pomocí vybraných proteinů respiračního řetězce (červeně) na podélném řezu levé komory srdce potkana s vizualizací jader (modře). Míra kolokalizace izoform HK v mitochondriálním kompartmentu je znázorněna intenzitou žluté barvy. (Autor obrázků B. Elsnicová).

HK, jako první enzym glykolýzy, se svojí aktivitou významně podílí na regulaci vstupu glukózy do kardiomyocytů a svalových vláken společně s glukózovými transportéry (GLUT1 a GLUT4), přičemž HK2 i obě izoformy GLUT jsou na transkripční úrovni regulovány HIF²⁵³⁻²⁵⁵. HK fosforyluje glukózu na glukózo-6-P (G6P) za spotřeby jednoho ATP, a tím udržuje koncentrační gradient glukózy nezbytný pro její tok do buňky²⁵⁶. Kapacita přenosu glukózy přes sarkolemu je dána počtem GLUT lokalizovaných na membráně, který je úzce spojen s aktivitou signálních drah PI3K/Akt a AMPK^{257,258}. Následné využití G6P není zcela jednoznačné, neboť může sloužit jak ke katabolickým, tak k anabolickým procesům v závislosti na typu tkáně, energetickém stavu buňky, izoformě HK, ale i na dalších podmínkách, jako je např. míra oxidativního stresu. Konkrétně může být G6P využíván i) k produkci ATP v glykolýze, ii) k produkci NADPH a ribuloso-5-P v pentosofosfátovém cyklu, který je v srdci minoritně zastoupen, avšak jeho podíl roste po stimulaci katecholaminy. Dále iii) k syntéze glykogenu a případně iv) k syntéze hexosaminů, jejichž úloha byla recentně popsána v I/R

poškozením srdce²⁵⁹. Nedávno byl též prokázán vliv G6P na homeostázu Ca^{2+} ²⁴⁸. Bylo ukázáno, že zvýšená aktivita HK může kompenzovat srdeční hypertrofii zvýšenou tvorbou substrátu pro pentosofosfátový cyklus a produkci NADPH, který může stimulovat NADPH oxidázu, ale i antioxidační ochranu. Bylo prokázáno, že experimentální snížení HK2 vede ke zvýšené produkci ROS a rozvoji hypertrofie srdce^{260–263}. Zvýšenou aktivitu HK je tedy potřeba uvažovat v tomto širokém kontextu možného působení G6P.

5.3.1. Exprese izoforem HK po adaptaci na hypoxii

V posledních deseti letech byly publikovány práce, které ukázaly, že vedle samotné úlohy G6P mají izofomy HK v srdci významný podíl na regulačních a signálních funkcích spojených s mitochondriální cestou apoptózy a autofágií^{264–266}. Naše výsledky toto poznání rozšířily o systematická pozorování na různých režimech hypoxie a následné krátkodobé I/R v obou srdečních komorách (**Příloha 8-11**).

Naše práce provedená na různých režimech mírné normobarické hypoxie ukázala, že exprese proteinu obou izoforem HK1 a HK2 v levé komoře se zvýšila ve všech použitých režimech (CNH, INH-8, INH-23) společně se specifickou enzymatickou aktivitou (**Příloha 9**). Potvrdili jsme, že pravá komora má za normoxických podmínek vyšší expresi proteinu HK1 i HK2 než levá komora, avšak vlivem mírné hypoxie se hladina enzymů v pravé komoře již dále neměnila. To podporuje představu o vyšší připravenosti pravé komory na hypoxickou zátěž i tlakové zatížení vlivem plicní hypertenze, která se i v tomto režimu rozvíjí. V levé komoře se exprese HK2 po CNH zvyšovala stejně, a to jak na úrovni mRNA, tak i proteinu, zatímco mRNA pro HK1 se překvapivě vlivem hypoxie nezměnila. Je známo, že hypoxie stabilizuje HIF, který je přímým transkripčním faktorem pro HK2²⁵⁴, což souhlasí s navýšením HK2 a zvýšenou expesí HIFv tomto režimu (**Přílohy 9 a 15**).

Rozdílné trendy ve změnách exprese proteinu a mRNA u HK1 jsme později pozorovali opakovaně, zatímco změny v mRNA HK2 bývají v souladu s hladinou proteinu. Tyto výsledky naznačují odlišnou regulaci transkripce mezi HK1 a HK2 (**Příloha 10**), které byly u izoforem HK1 a HK2 již popsány na kvasinkách a HeLa buňkách^{267,268}. Bylo ukázáno, že exprese HK2 může být regulovaná pozitivní zpětnou vazbou za současné negativní regulace exprese HK1²⁶⁷. Tento nálezn je zajímavý a jeho fyziologický význam ani podstata tohoto regulačního mechanismu u savců není dosud známa. Další rozdíly jsme pozorovali v expresi izoforem HK mezi levou a pravou komorou po extrémní IHH, kde v průběhu adaptace dochází k tlakovému i objemovému přetížení spolu se sníženou dostupností kyslíku, a to vede k vysokému stupni

přetížení pravé komory. V pravé komoře již nedošlo ke klasické kompenzační odpovědi na úrovni zvýšení exprese HK2 a naopak exprese HK1 dokonce klesla¹⁵¹ (Kolář D. et al. v přípravě). Je známo, že za fyziologických podmínek je HK1 převážně asociovaná s mitochondriemi a spojována s glykolýzou, zatímco v cytosolu lokalizovaná HK2 je spojována se syntézou glykogenu^{269–271}. Zdá se tedy, že HK2 by mohla za hypoxických či ischemických stavů, kdy jsme pozorovali její translokaci na mitochondrie, přebírat úlohu v glykolýze a využít své lepší kinetické vlastnosti ve zhoršených energetických podmínkách.

Vedle toho jsme po IHH v levé komoře pozorovali nárůst fetální izoformy laktát dehydrogenázy LDH A^{272,273} a monokarboxylového přenašeče MCT4²⁷⁴ spolu s hladinami obou izoform HK1 a HK2. To může ukazovat na zvýšení podílu produkce ATP pomocí anaerobní glykolýzy a současné posílení odstraňování laktátu z kardiomyocytů (Kolář D. et al., v přípravě). V souladu s tím jsou naše další nepublikovaná data (Kolář D. et al.), která ukazují snížení aktivity citrát syntázy a komplexu I respiračního řetězce po IHH na izolovaných mitochondriích. Souhlasné trendy na úrovni exprese u izolovaných mitochondrií uvádějí Hlaváčková et al. (2010)²⁷⁵.

Další zajímavé změny jsme zaznamenali po krátké expozici I/R, kdy vzrostly hladiny proteinů obou izoform HK po desetiminutové ischemii ve skupině CNH ve srovnání s normoxickou kontrolou (**Příloha 11**)⁸⁸. Podobně jsme zaznamenali zvýšení hladiny proteinu po ischemii také u LDH na stejném modelu perfundovaného srdce *ex vivo* (Diplomová práce D. Kolář 2013). Vzhledem k tomu, že na úrovni mRNA jsme nepozorovali žádné změny a doba ischemie v našem experimentu byla relativně krátká, vysvětlujeme si tento nárůst náhlým útlumem proteazomální degradace obou klíčových glykolytických enzymů. Tento nálezn může být fyziologicky významný, neboť ukazuje jeden z mechanismů rychlého posílení anaerobního metabolismu glukózy, který přispívá k zachování energetické homeostázy v myokardu při náhlém přerušení dodávky kyslíku a současně dokládá vyšší obrat proteinu LDH a HK u adaptovaných srdcí.

5.3.2. Asociace izoforem HK na vnější mitochondriální membránu je protektivní

Subcelulární lokalizace jednotlivých izoforem HK je přímo spjata s jejich úlohou v myokardu²⁷⁰ a právě otázka lokalizace a translokace hlavních izoforem HK v srdci byla předmětem našeho dalšího zájmu. Je známo, že za fyziologických podmínek je HK1 převážně asociována s vnější mitochondriální membránou, kde podporuje glykolýzu^{90,268}. Současně bylo zjištěno, že její odstranění z mitochondrií zvýšilo pravděpodobnost aktivace apoptózy přes dráhu TNF α ²⁶⁵. Naproti tomu HK2 se za klidových fyziologických podmínek nachází převážně v cytosolu, kde je spojena se syntézou glykogenu^{90,270,271,276}. HK3 není v srdci dostatečně dokumentována a naše nepublikovaná data ji zobrazují výhradně vázanou na mitochondriích (Obr. 7). V podmínkách zvýšeného stresu dochází k translokaci HK2 na vnější mitochondriální membránu²⁷⁷. Bylo prokázáno, že přítomnost HK2 i HK3 na mitochondriální membráně umožňuje zvýšit transport ADP do matrix mitochondrií k ATP syntéze prostřednictvím přednostního metabolického toku, což udržuje mitochondrie ve spřaženém stavu a brání nadměrné produkci volných radikálů^{266,278}. Obdobné funkční spřažení s ATP syntázou vytváří oktamer mtCKs lokalizovaný v intermembránovém prostoru, avšak terciální struktura oktameru je velmi citlivá na oxidativní stres na rozdíl od dimeru HK.

Lokalizace HK izoforem je tedy klíčová pro jejich specifickou funkci²⁷⁹. Je známo, že zvýšená asociace HK izoforem s VDAC na vnější mitochondriální membráně poskytuje významnou ochranu u mnoha typů buněk a v posledních letech byla prokázána jako kardioprotektivní (**Příloha 10**)^{151,209,280,281}. Dále, bylo zjištěno, že HK2 kompetuje o vazebné místo na VDAC s pro-apoptickým proteinem Bax, a tím snižuje pravděpodobnost aktivace apoptózy²⁸²⁻²⁸⁷. Translokace HK2 na vnější mitochondriální membránu byla v kardiomyocytech experimentálně vyvolána mnoha různými podněty, např. aktivací dráhy Akt, zvýšenou koncentrací glukózy a inzulínu, a též po podání morfinu²⁰⁹. Naše práce ukázala, že ke zvýšení kolokalizace obou izoforem HK1 i HK2 s mitochondriemi dochází po adaptaci na extrémní IHH, zatímco mírná CNH tuto kolokalizaci nezvýšila^{9,151} (**Přílohy 9 a 10**). Vedle zmíněných stimulů bylo již dříve zjištěno, že vazba HK2 je posílena zvýšenou hladinou Pi a dvojmocných kationtů, ke které fyziologicky dochází při sympatické stimulaci srdce nebo na počátku ischemie. Naopak oslabení vazby bylo vyvoláno externím zvýšením ATP anebo G6P^{90,288}. V souladu s tím jsme nedávno ukázali velký nárůst asociace HK1 i HK2 v krátkodobé ischemii s mitochondriemi jak u kontrolních zvířat, tak i po adaptaci na CNH. Toto navýšení bylo doprovázeno zvýšením fosforylace celkové Akt na Ser⁴⁷³ a zvýšenou aktivací AMPK. Rozdíl mezi skupinami se projevil až v reperfúzi (10 min), kdy u neadaptované

skupiny došlo k disociaci HK2 z mitochondrií a CNH této ztrátě zabránila (**Příloha 11**). V návaznosti na tyto výsledky je vhodné uvést, že Pasdois et al. zjistili, že dlouhodobá ischemie (30 min) již způsobila disociaci HK2 z mitochondrií, což vedlo k otevření MPT póru. Stejně tak experimentální odstranění HK z mitochondrií ukázalo velmi detrimentální účinky na srdce^{262 264,285–287,289}. Dále Pasdois et al.²⁸⁹ ukázali, že protektivní účinek ischemického preconditioningu spočívá ve stabilizaci vazby, která bránila disociaci HK2 z mitochondriálního kompartmentu, což mělo za následek snížený výlev cytochromu c z mitochondrií, snížení oxidativního stresu a snížení pravděpodobnosti otevření MPT póru²⁴⁷. V současné době můžeme tedy rozlišit dva protektivní fenomény na úrovni interakce HK2 s VDAC, a to buď zvýšení asociace HK2 s vnější mitochondriální membránou anebo stabilizaci vazby, která brání jejímu odpojení.

Výše uvedené poznatky můžeme shrnout tak, že krátkodobá ischemie, nebo dlouhodobá adaptace na extrémní hypoxii zvyšují asociaci HK2 s mitochondriemi a dále, že adaptace na mírnou hypoxii brání odpojení HK2 z mitochondrií v průběhu reperfúze. Z toho vyplývá, že translokace HK2 na vnější mitochondriální membránu je závislá na parciálním tlaku kyslíku a může být tedy významným mechanismem, který brání aktivaci apoptózy a udržuje integritu mitochondriálního metabolismu v podmínkách významného nedostatku kyslíku²¹⁶ (**Přílohy 9-11**).

5.3.3. *Vliv hypoxie a hypertrofie na lokalizaci izoform hexokinázy*

Ukázali jsme, že asociace HK2 s mitochondriemi vzrůstá se stupněm hypoxie, avšak s rostoucí hypoxickou zátěží dochází k přetížení levé i pravé komory a následkem toho se rozvíjí jejich hypertrofie. Dále je známo, že Akt signální dráha hraje významnou úlohu v hypertrofii srdce. Proto jsme si položili otázku, jakou roli hrají hypertrofické mechanismy ve zvýšené asociaci HK2 s mitochondriemi.

U kontrolních potkanů Wistar jsme nepozorovali rozdíl v asociaci izoform HK s mitochondriemi mezi pravou a levou komorou, i přestože exprese a aktivace dráhy Akt je v pravé komoře vyšší (**Příloha 8**). U IHH, při které je nižší pO₂ ve srovnání s CNH, se zvýšila asociace HK s mitochondriemi na podélných řezech levé komory zhruba o 20 % a současně vzrostlo množství obou izoform HK v mitochondriálních frakcích téměř na dvojnásobek. Je třeba zdůraznit, že mitochondriální asociace HK2 po IHH byla v pravé komoře významně vyšší než v levé (**Příloha 10**). Vystává tedy otázka, zda tento jev souvisí se zmíněnou vyšší expresí

Akt již za normoxických podmínek anebo s vyšším rozvojem hypertrofie pozorované po IHH během 5 týdnů adaptace.

Odpověď jsme hledali na fyziologickém modelu u mladých tříměsíčních a šestiměsíčních potkanů SHR, kde je hypertrofie v kompenzované fázi, a následně u starých třináctiměsíčních potkanů, kde hypertrofie přechází do dekompenzované fáze a vede k následnému srdečnímu selhání^{150,290}. Můžeme tedy předpokládat, že u 12-24 týdnů starých SHR je metabolismus a fenotyp srdce ještě dostatečně plastický a změny vyvolané zátěží budou reverzibilní. Změna fenotypu u kosterních svalů i srdce se stanovuje na základě poměru izoform rychlejšího a pomalejšího těžkého řetězce myozinu, což je u srdce MyHC α a MyHC β v uvedeném pořadí^{125,291,292}. Ukázali jsme, že u SHR tato plasticita významně klesá s věkem. Tlakové přetížení a následná hypertrofie zvýšily podíl více ekonomické izoformy MyHC β na úkor rychlejší MyHC α u mladých i starých potkanů, avšak u mladých potkanů SHR bylo možné tento poměr normalizovat podáváním n-3 polynenasycených mastných kyselin (PUFA), zatímco u starých potkanů nemělo podávání PUFA vliv^{291,293,294} (**Přílohy 6 a 14**). Pokud jde o izoformy HK, u potkanů SHR byla vyšší asociace HK1 s mitochondriemi již u šetíměsíčních zvířat a přetrvávala zvýšená i ve věku třinácti měsíců ve srovnání s normotenzním kmenem WKY. Naproti tomu asociace HK2 s mitochondriemi byla vyšší u šestiměsíčních a významně poklesla u třináctiměsíčních zvířat. Adaptace na CNH neukázala změny u tříměsíčních potkanů SHR v asociaci HK2 s mitochondriemi, a naopak se HK2 objevila v příčných pruzích v oblasti I-pruhu sarkomer (nepublikované výsledky Heleš a Elsnicová). Tyto výsledky jasně ukazují, že zvýšená kolokalizace HK2 s mitochondriemi nesouvisí s mechanismy zodpovědnými za hypertrofii ani v jejím raném stádiu ani v pokročilém stavu. U mladých SHR potkanů jsme ukázali, že účinky CNH a hypertrofie nejsou aditivní (**Příloha 13**). Je vhodné zmínit, že u extrémní IHH je kolokalizace zvýšená, a podobně jako u SHR, je zde rozvinuta hypertrofie a významně snížen poměr MyHC α /MyHC β ³³³. Dále z našich studií vyplývá, že regulace asociace HK1 a HK2 s mitochondriemi je za námi zvolených podmínek nezávislá, podobně jako jejich exprese. Tuto nezávislou regulaci též pozorovali Southworth et al., kdy podání oleátu snížilo asociaci HK1 a nikoliv HK2 na modelu asociace stimulované inzulinem²⁷⁷. Lze tedy předpokládat, že v případě IHH může být zvýšení asociace obou izoform HK způsobeno kombinovanou extrémní hypoxií v případě HK2, a významnou hypertrofií v případě HK1¹⁵¹.

5.4. Odpověď srdce na kardioprotektivní režim mírné a extrémní hypoxie se liší

Jak je uvedeno výše, zjistili jsme, že aktivace protektivní signální dráhy Akt/HK a CK systému se v jednotlivých režimech hypoxie liší. Pro lepší pochopení funkce obou systémů bylo důležité zasadit nové poznatky do kontextu širší odpovědi myokardu na uvedené podmínky. Je známo, že v hypoxii dochází k tvorbě ROS, které v přiměřené hladině aktivují protektivní buněčnou odpověď spojenou s HIF, avšak tato hladina se může s mírou hypoxie lišit^{295–299}. V souvislosti s tím jsme sledovali míru oxidativního stresu a odpověď antioxidantního systému a adrenergní signalizace v protektivních režimech adaptace na mírnou (CNH, INH) a extrémní (IHH) hypoxii a v neprotektivním režimu (CNH-R)^{195,300} (**Přílohy 15 a 16**; Kašparová et al. v přípravě.). Tyto výsledky umožňují vzájemné srovnání i s výsledky již dříve publikovanými po adaptaci na IHH^{147,301}, avšak mnoho dalších literárních zdrojů toto srovnání neumožňuje vzhledem k odlišným režimům adaptace.

Ukázali jsme, že protektivní režimy mírné hypoxie CNH i INH, stimulují v levé komoře expresi mRNA většiny antioxidantních enzymů, hodnota poměru GSH/GSSG se nezměnila, což naznačuje dobře kompenzovanou produkci ROS u obou režimů mírné hypoxie. Naopak, hodinová reoxygenace u neprotektivního CNH-R oxidativní stres zvýšila¹⁹⁵; (**Příloha 15**). Zvýšené transkripty antioxidantů v protektivních režimech patří mezi mitochondriální izoformy příslušných enzymů. Tyto nálezy u CNH jsou v souladu s předchozími publikacemi, které dokládají, že mírná hypoxie v chronických režimech zvyšuje expresi nebo aktivitu mitochondriální superoxididismutázy MnSOD v srdci^{146,302,303} a k podobné odpovědi dochází po akutní expozici extrémní hypoxii (5 hodin, $FIO_2 = 0.06$)³⁰⁴. Významnou úlohu MnSOD v kardioprotekci dokládají práce, ve kterých její zvýšená exprese podpořila ischemickou odolnost srdce³⁰⁵ a naopak snížení její exprese po podání antioxidantu eliminovalo protektivní účinek adaptace na IHH¹⁴⁷. Režim INH překvapivě stimuloval antioxidantní kapacitu ještě více než CNH; což může souviset s opakovanou dlouhodobější reoxygenací, která osvěžuje aktivity transkripčních faktorů pro antioxidanty, HIF a NRF2 (**Příloha 15**)^{210,306}. Naproti tomu krátká reoxygenace CNH-R v průběhu chronické adaptace potlačila aktivaci téměř všech sledovaných transkriptů antioxidantního systému. Zdá se, že tento režim působí jako nevhodný stresor pro iniciaci kardioprotektivních mechanismů. Pomocí korelační analýzy jsme ukázali, že neprotektivní režim CNH-R nepodporuje expresi mRNA transkriptů významných transkripčních faktorů *Hif1a*, *Hif2a* a *Nrf2* (gen *Nfe2l2*), což může být klíčem k pochopení negativního působení krátké reoxygenace v průběhu kontinuální chronické hypoxie spolu s vychýlením redoxní rovnováhy. V mitochondriálním kompartmentu je redoxní rovnováha

udržována pomocí thioredoxinového systému izoforem thioredoxinu a jeho reduktázy (TXN2/TXRD2) a je známo, že pro aktivaci HIF je nutná přiměřená produkce ROS během hypoxie³⁰⁷. Podobně aktivace NRF2 vyžaduje zvýšený oxidativní stres v cytosolu, který je následně kompenzován v jádře systémem TXN1/TXRD1^{308,309}. Z uvedených výsledků usuzujeme, že zvýšená endogenní antioxidační ochrana se významně podílí na kardioprotektivním fenotypu adaptace na mírnou hypoxii (**Příloha 15**).

Naproti tomu u extrémní IHH bylo ukázáno významné zvýšení oxidativního stresu, jak na úrovni poměru GSH/GSSG a akumulace lipofuscinu¹⁴⁷, tak na úrovni hladiny nitrotyrosinu²⁷⁵. Současně zůstala beze změny aktivita MnSOD, katalázy a glutathionperoxidázy v homogenátu levé komory, ale zvýšila se aktivita a exprese MnSOD v subsarkolemální mitochondriální frakci³¹⁰. Navíc jsme na úrovni mRNA pozorovali zvýšenou expresi kaspázy 3 a 8 (Kašparová, nepublikované výsledky) a kaspázy 3 i na úrovni proteinu spolu se zvýšením poměru Bax/Bcl2 jako pro-apoptotického indikátoru (Disertační práce, K. Holzerová 2016, Diplomová práce T. Blahová 2014). Zde je vhodné podotknout, že u tohoto modelu adaptace byla pozorována remodelace obou komor na úrovni aktivity MyHC a exprese kolagenu, která je v raných stádiích v pravé komoře doprovázena nekrotickými lézemi³¹¹.

Naše dosud nepublikované výsledky získané po adaptaci na IHH (Kašparová et al. v přípravě) ukázaly, že IHH na rozdíl od mírných normobarických režimů nezvyšuje expresi antioxidačních enzymů na úrovni proteinu, navíc na úrovni mRNA se mnoho z nich dokonce snižuje. Je třeba zdůraznit, že IHH naopak zvýšila na úrovni proteinu inducibilní hemoxygenázu 1 (HMOX1) (Kašparová et al. v přípravě), což nebylo pozorováno po CNH³¹². V souladu s tím je HMOX1 často spojována s cytoprotektivním účinkem a proliferační funkcí v podmínkách vyššího oxidativního stresu^{304,313–315}. Její zvýšení bylo pozorováno např. po kardiotoxickém inzultu doxorubicinem³¹⁶. Podobně experimentálně zvýšená exprese HMOX1 snížila poškození po anoxickém inzultu v souvislosti s aktivací Akt³¹³. Protektivní vliv HMOX1 se může realizovat na dvou základních úrovních, buď přes biliverdinreduktázu³¹⁷, jejíž zvýšení jsme po IHH adaptaci nepotvrdili, anebo přes produkovaný CO, jehož signální dráhy jsme již neanalyzovali. Existují údaje i o možném spojení s HIF a TNF α , jejichž přiměřená aktivita je v současné době často spojována s kardioprotekcí^{312,318–321}. Přesto, že by se z našich výše uvedených výsledků (Kašparová et al. v přípravě) mohlo zdát, že je úloha antioxidačního systému v této adaptaci minoritní, podávání N-acetylcysteinu v průběhu adaptace na IHH významně snížilo její kardioprotektivní efekt, avšak úplně jej nezablokovalo¹⁴⁷. Tento experiment ukázal významnou, avšak ne úplnou roli oxidativního stresu v mechanismu

kardioprotekce po IHH adaptaci, který by mělo smysl ještě dále studovat. Naše nepublikovaná data ukazují přesum TXN1 do jádra a zvýšení jeho redukované formy v tomto kompartmentu po IHH, což může svědčit ve prospěch zvýšené aktivity transkripčních faktorů závislých na změně redoxního stavu.

Další rozdíl mezi režimy mírné a hluboké hypoxie jsme pozorovali na úrovni aktivace adrenergí signalizace. Režimy mírné hypoxie CNH a INH neukázaly změny v expresi izoform adrenergických receptorů β (β -AR) ani u dominantních izoform adenylátcyklázy (AC5/6) a G proteinů v levé komoře. Pouze v pravé komoře, zatížené hypertrofií, došlo k 21% nárůstu β 1-AR. Stimulovaná aktivita AC pomocí G proteinů se zvýšila v levé komoře a snížila v komoře pravé (**Příloha 16**). Naproti tomu IHH významně zvýšila poměr β 2/ β 1 receptorů na základě zvýšení β 2-ARs a poklesu v β 1-ARs. Současně zde poklesla exprese AC téměř o 50 % a naopak $G_{i\alpha}$ proteiny se zvýšily o stejný podíl. Tyto nálezy nasvědčují přesmyku signalizace z β 1-AR/Gs na β 2-AR/ G_i , kdy klesá stimulace AC a zvyšuje se aktivace MAP-kinázových drah včetně Akt, jejichž sestupné dráhy jsou spojovány s kardioprotektivním fenotypem a mohou mít protektivní charakter (**Příloha 17**). Obdobné výsledky získala Hrbasova et al.³⁰¹ a podání trimepranolu u tohoto modelu snížilo plicní hypertenzi a remodelaci pravé i levé komory³¹¹.

6. SOUHRN

Přinesli jsme nové poznatky o systému kreatin kinázy (CK) v kosterním svalu a v srdci. Hexokinázou (HK) jsme se zabývali především v srdci v souvislosti s kardioprotekcí. Funkci obou systémů jsme sledovali v subcelulárních kompartmentech s vysokou produkcí a spotřebou energie, tedy v oblasti mitochondrií a sarkomery. Přispěli jsme k porozumění mechanismu endogenní kardioprotekce indukované různými režimy hypoxie, které se lišily její intenzitou a délkou expozice. Je známo, že na fyziologické úrovni mají tyto protektivní režimy rozdílný dopad na odolnost myokardu k I/R poškození a na jeho citlivost k výskytu a závažnosti arytmií, zatímco podstata těchto rozdílů na molekulární úrovni a na úrovni energetického metabolismu nebyla dosud zcela známa. Naše výsledky přispěly k většímu porozumění hypoxií stimulované signální dráhy proteinkinázy B (Akt), HK a CK systému a jejich vzájemným funkčním vztahům. Naší snahou bylo také přinést další poznatky o úloze oxidativního stresu, antioxidantního systému, vybraných transkripčních faktorů a apoptózy v mechanismu kardioprotekce indukované adaptací na chronickou hypoxii.

Naše hlavní výsledky

Na kosterním svalu jsme ukázali, že u myofibrilární izoformy CKM vázané v M-linii sarkomery dochází k její dynamické výměně s okolím v závislosti na pH a konformačním stavu. Tento poznatek naznačuje, že za různých patologických stavů by mohlo dojít k výpadku její funkce v důsledku zhoršené vazby. Výsledek funkční studie potvrdil, že k maximálnímu přednostnímu toku ATP mezi CKM vázanou v M-linii sarkomery a myozinovou ATPázou dochází v mírně kyselém prostředí (pH 6.95), kdy fenomén „substrate channeling“ dosahuje 42 %.

U srdečního svalu jsme zjistili, že aktivita CK systému ve všech režimech mírné normobarické hypoxie (CNH) roste, a to v souvislosti s nárůstem fetální a mitochondriální izoformy. Adaptace na CNH také zabránila poklesu mtCKs v průběhu I/R. Výše uvedené nálezy mohou hrát roli v kardioprotektivním fenotypu srdce po mírné CNH. Naproti tomu u extrémní hypobarické hypoxie (IHH) dochází vedle nárůstu izoformy CKB k poklesu exprese mitochondriální mtCKs. U zvířat adaptovaných na IHH následná ischemie snížila obsah CKM v M-linii sarkomery, což může snížit kontraktilitu srdce v průběhu ischemie a šetřit ATP.

Zjistili jsme, že v pravé srdeční komoře je vyšší exprese Akt a HK a aktivace pomocí fosforylace ve srovnání s levou komorou. Následná mírná hypoxie CNH zvýšila aktivitu i expresi obou izoform hexokinázy pouze v levé komoře. V souvislosti s tím může vyšší podíl

glukózového metabolismu významně přispívat k vyšší připravenosti pravé komory na zátěžové podmínky.

Ukázali jsme, že krátkodobá ischemie (10 min) významně zvyšuje aktivitu Akt/HK dráhy a zároveň zvyšuje asociaci HK2 s mitochondriemi jak u kontrol, tak po CNH. V reperfuzi však přetrvávala asociace HK2 s mitochondriemi pouze u adaptovaného myokardu. Vedle toho CNH snížila poměr pro-apoptického Bax/Bcl2 během I/R. Z toho vyplývá, že dráha Akt/HK může hrát významnou úlohu v kardioprotektivním fenotypu indukovaném adaptací na CNH.

Ukázali jsme, že mitochondriální genom může hrát významnou úlohu v odolnosti k I/R v souvislosti s aktivací cílové dráhy HIF/Akt2. Na hypertenzním konplastickém kmeni potkanů SHR-mtBN jsme po adaptaci na CNH pozorovali zvýšenou odolnost mitochondrií k Ca^{2+} přetížení spolu s významně vyšší expresí HIF2/Akt2 a aktivitou HK ve srovnání s referenčním kmenem SHR.

Ukázali jsme, že extrémní IHH významně zvyšuje asociaci HK1 i HK2 s mitochondriemi spolu se zvýšenou aktivitou a expresí obou izoform. Ve srovnání s tím mírná CNH zvyšuje pouze expresi obou izoform a celkovou enzymatickou aktivitu HK.

Zjistili jsme, že kardioprotektivní režimy mírné hypoxie CNH a INH-8 zvyšují expresi převážně mitochondriálních antioxidantních enzymů, které zabránily rozvoji oxidačního stresu. Naproti tomu v neprotektivním režimu CNH s 1 hod reoxygenací/den byla odpověď antioxidantního systému významně oslabena.

U extrémní IHH, kde je přítomen oxidační stres a hypertrofie levé komory, jsme zjistili, že na úrovni transkriptu mRNA dochází k potlačení odpovědi antioxidantního systému kromě zvýšené exprese thioredoxinu 1 (TXN1) a hemoxygenázy 1 (HMOX1). Navíc jsme po IHH zaznamenali translokaci TRX1 a NFkB do jádra, což svědčí o zvýšené transkripční aktivitě NFkB.

Zatímco režimy mírné CNH a INH neměly na adrenergní signalizaci vliv, extrémní IHH významně zvýšila poměr β_2/β_1 adrenergních receptorů, současně poklesla exprese adenylátcyklázy téměř o 50 % a naopak exprese $G_i\alpha$ proteinu vzrostla.

Ukázali jsme, že Akt1 a Akt2 jsou lokalizovány převážně v oblasti sub-sarkolemálních mitochondrií, nikoliv na sarkolemě. Extrémní IHH jejich lokalizaci neovlivnila, ale následná krátkodobá ischemie značně zvýšila asociaci Akt2 s mitochondriemi. Je proto pravděpodobné, že pleiotropní protektivní efekt Akt2 by mohl hrát roli v endogenní kardioprotekci za podmínek extrémní IHH.

7. ZÁVĚR

Popsali jsme funkční a strukturní vlastnosti myofibrilární CKM, které přispívají k porozumění patologických stavů zasahujících do přednostního metabolického toku mezi CKM a myozinovou ATPázou u kosterního svalu. Následně jsme u ischemického a hypertrofovaného srdce pozorovali změny tohoto systému.

Z našich výsledků zaměřených na endogenní kardioprotekci vyplývá, že signální dráhy se mohou lišit po adaptaci na mírnou CNH a extrémní IHH. Našli jsme zde rozdíly v míře oxidativního stresu, které mohou vést k aktivaci odlišné transkripční odpovědi. Po mírné CNH je produkce ROS kompenzována na úrovni mitochondriálních antioxidantů a cytosolického thioredoxinového systému. Naproti tomu po IHH jsme pozorovali, že antioxidantní systém je aktivován pouze na úrovni dráhy TXN1-NFkB-HMOX1. Další rozdíly jsme prokázali na úrovni adrenergní signalizace a exprese izoform HIF. Mírná CNH zvýšila aktivitu obou systémů CK i Akt/HK, ale nezvýšila asociaci HK s mitochondriemi. V kontrastu s tím extrémní IHH a krátkodobá ischemie zvýšily asociaci jak HK1, tak HK2 s vnější mitochondriální membránou. Předpokládáme, že obě izoformy tohoto enzymu by mohly částečně nahradit klesající funkci mtCKs, udržovat mitochondriální membránový potenciál na přiměřené úrovni a regulovat tak nadměrnou tvorbu ROS.

Naše výsledky spolu s předchozími nálezy naznačují, že významnou součástí protektivního fenotypu CNH je zvýšení kapacity antioxidantního systému, posílení glukózového metabolismu a systému CK. Naproti tomu u IHH se výše uvedené dráhy již neaktivují a s rostoucím oxidativním stresem jsou stimulovány pro-apoptické dráhy, které ale zjevně nejsou naplno spuštěny a jsou pravděpodobně blokovány na více úrovních anti-apoptickými drahami. Zjistili jsme, že jedním z významných anti-apoptických mechanismů v této adaptaci je zvýšená asociace HK s mitochondriemi, která snižuje pravděpodobnost otevření MPT póru a tím blokuje aktivaci apoptózy mitochondriální cestou.

REFERENCE

1. Ellington, W. R. Phosphocreatine represents a thermodynamic and functional improvement over other muscle phosphagens. *J. Exp. Biol.* 143, 177–194 (1989).
2. Wallimann, T. & Hemmer, W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol. Cell. Biochem.* 133–134, 193–220
3. Hubley, M. J., Rosanske, R. C. & Moerland, T. S. Diffusion coefficients of ATP and creatine phosphate in isolated muscle: pulsed gradient 31P NMR of small biological samples. *NMR Biomed.* 8, 72–8 (1995).
4. Meyer, R. A., Sweeney, H. L. & Kushmerick, M. J. A simple analysis of the “phosphocreatine shuttle”. *Am. J. Physiol.* 246, C365–77 (1984).
5. Gabr, R. E., El-Sharkawy, A.-M. M., Schär, M., Weiss, R. G. & Bottomley, P. A. High-energy phosphate transfer in human muscle: diffusion of phosphocreatine. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301, C234–41 (2011).
6. Bessman, S. P. & Carpenter, C. L. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 831–862 (1985).
7. Wegmann, G., Zanolla, E., Eppenberger, H. M. & Wallimann, T. In situ compartmentation of creatine kinase in intact sarcomeric muscle: the acto-myosin overlap zone as a molecular sieve. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13, 420–435 (1992).
8. Maláčová D., Žurmanová J., Mejsnar J: Three isoelectric points of creatine kinase M subunit, purified from myofibrils. *Physiol. Res.*53: 22P, 2004.
9. Arnostova, P. *et al.* Chronic Hypoxia Enhances Expression and Activity of Mitochondrial Creatine Kinase and Hexokinase in the Rat Ventricular Myocardium. *Cell. Physiol. Biochem.* 33, 310–320 (2014).
10. Zurmanova, J. *et al.* Creatine kinase binds more firmly to the M-band of rabbit skeletal muscle myofibrils in the presence of its substrates. 305, 55–61 (2007).
11. Simionescu-Bankston, A. *et al.* Creatine kinase B is necessary to limit myoblast fusion during myogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 308, C919–31 (2015).
12. Sistermans, E. A. *et al.* Tissue- and cell-specific distribution of creatine kinase B: a new and highly specific monoclonal antibody for use in immunohistochemistry. *Cell Tissue Res.* 280, 435–446 (1995).
13. Schlegel, J. *et al.* Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. I. Isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase: characterization, localization, and structure-function relationships. *J. Biol. Chem.* 263, 16942–53 (1988).
14. Bessman, S. P. & Geiger, P. J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* 211, 448–52 (1981).
15. Hetland, O. & Dickstein, K. Cardiac markers in the early hours of acute myocardial infarction: clinical performance of creatine kinase, creatine kinase MB isoenzyme (activity and mass concentration), creatine kinase MM and MB subform ratios, myoglobin and cardiac troponin T. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 56, 701–13 (1996).
16. Karras, D. J. & Kane, D. L. Serum markers in the emergency department diagnosis of acute myocardial infarction. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 19, 321–37 (2001).
17. Brancaccio, P., Maffulli, N. & Limongelli, F. M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br. Med. Bull.* 81–82, 209–230 (2007).
18. Cabaniss, C. D. *Creatine Kinase. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* (1990).
19. Yamamichi, H. & Ohkawa, J. [Human creatine kinase deficiency]. *Rinsho Byori.* 50, 576–583 (2002).
20. Yamamichi, H. *et al.* Creatine kinase gene mutation in a patient with muscle creatine kinase deficiency. *Clin. Chem.* 47, 1967–1973 (2001).
21. Hashikata, T. *et al.* Deficiency of creatine kinase in a ST-segment elevation myocardial infarction patient with Kartagener syndrome. *Int. J. Cardiol.* 182, 31–33 (2015).

22. Novotová, M., Tarabová, B., Tylková, L., Ventura-Clapier, R. & Zahradník, I. Ultrastructural remodelling of slow skeletal muscle fibres in creatine kinase deficient mice: a quantitative study. *Gen. Physiol. Biophys.* 35, 477–486 (2016).
23. Eppenberger-Eberhardt, M. *et al.* Adult rat cardiomyocytes cultured in creatine-deficient medium display large mitochondria with paracrystalline inclusions, enriched for creatine kinase. *J. Cell Biol.* 113, 289–302 (1991).
24. Kitzenberg, D., Colgan, S. P. & Glover, L. E. Creatine kinase in ischemic and inflammatory disorders. *Clin. Transl. Med.* 5, 31 (2016).
25. Steeghs, K. *et al.* Cytoarchitectural and metabolic adaptations in muscles with mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. *Mol. Cell. Biochem.* 184, 183–194 (1998).
26. Nahrendorf, M. *et al.* Creatine kinase knockout mice show left ventricular hypertrophy and dilatation, but unaltered remodeling post-myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 65, 419–427 (2005).
27. Ventura-Clapier, R. *et al.* Muscle creatine kinase-deficient mice. I. Alterations in myofibrillar function. *J. Biol. Chem.* 270, 19914–19920 (1995).
28. van Deursen, J. *et al.* Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. *Cell* 74, 621–31 (1993).
29. Dahlstedt, A. J., Katz, A., Tavi, P. & Westerblad, H. Creatine Kinase Injection Restores Contractile Function in Creatine-Kinase-Deficient Mouse Skeletal Muscle Fibres. *J. Physiol.* 547, 395–403 (2003).
30. Steeghs, K. *et al.* Altered Ca²⁺ Responses in Muscles with Combined Mitochondrial and Cytosolic Creatine Kinase Deficiencies. *Cell* 89, 93–103 (1997).
31. Lygate, C. A. *et al.* Chronic creatine kinase deficiency eventually leads to congestive heart failure, but severity is dependent on genetic background, gender and age. *Basic Res. Cardiol.* 107, 276 (2012).
32. Nahrendorf, M. *et al.* Multimodal functional cardiac MRI in creatine kinase-deficient mice reveals subtle abnormalities in myocardial perfusion and mechanics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H2516–21 (2006).
33. Gupta, A. *et al.* Creatine kinase-mediated improvement of function in failing mouse hearts provides causal evidence the failing heart is energy starved. *J. Clin. Invest.* 122, 291–302 (2012).
34. van Beek, J. H. G. M. Adenine nucleotide-creatine-phosphate module in myocardial metabolic system explains fast phase of dynamic regulation of oxidative phosphorylation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C815–29 (2007).
35. Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M. & Schlattner, U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids* 40, 1271–1296 (2011).
36. O’Gorman, E., Piendl, T., Müller, M., Brdiczka, D. & Wallimann, T. Mitochondrial intermembrane inclusion bodies: the common denominator between human mitochondrial myopathies and creatine depletion, due to impairment of cellular energetics. *Mol. Cell. Biochem.* 174, 283–9 (1997).
37. Hatano, E. *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor-induced apoptosis in transgenic mouse liver expressing creatine kinase. *Liver Int.* 24, 384–93 (2004).
38. Sestili, P. *et al.* Creatine as an antioxidant. *Amino Acids* 40, 1385–1396 (2011).
39. Bürklen, T. S., Hirschy, A. & Wallimann, T. Brain-type creatine kinase BB-CK interacts with the Golgi Matrix Protein GM130 in early prophase. *Mol. Cell. Biochem.* 297, 53–64 (2007).
40. Dolder, M., Walzel, B., Speer, O., Schlattner, U. & Wallimann, T. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J. Biol. Chem.* 278, 17760–17766 (2003).
41. Lawler, J. M., Barnes, W. S., Wu, G., Song, W. & Demaree, S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 47–52 (2002).
42. Tokarska-Schlattner, M. *et al.* Phosphocreatine interacts with phospholipids, affects membrane properties and exerts membrane-protective effects. *PLoS One* 7, e43178 (2012).
43. Lorenzi, E., Piacenza, G., Strumia, E. & Borgoglio, R. [Pharmacokinetics of phosphocreatine following intravenous administration in humans and effect on blood levels of ATP]. *Cardiologia* 32, 1031–4 (1987).
44. Chambers, D. J. *et al.* St. Thomas’ Hospital cardioplegia: enhanced protection with exogenous creatine phosphate. *Ann. Thorac. Surg.* 61, 67–75 (1996).

45. Cafiero, M., Strumia, E., Pirone, S., Pacileo, S. & Santoro, R. [The efficacy of creatine phosphate in the treatment of patients with heart failure. Its echographic evaluation after acute and protracted treatment]. *Clin. Ter.* 144, 321–8 (1994).
46. Saks, V. A., Dzhalishvili, I. V., Konorev, E. A. & Strumia, E. [Molecular and cellular aspects of the cardioprotective mechanism of phosphocreatine]. *Biokhimiia* 57, 1763–84 (1992).
47. Strumia, E., Pelliccia, F. & D'Ambrosio, G. Creatine phosphate: pharmacological and clinical perspectives. *Adv. Ther.* 29, 99–123 (2012).
48. Bender, A., Samtleben, W., Elstner, M. & Klopstock, T. Long-term creatine supplementation is safe in aged patients with Parkinson disease. *Nutr. Res.* 28, 172–178 (2008).
49. Landoni, G. *et al.* Cardiac protection with phosphocreatine: a meta-analysis. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 23, 637–646 (2016).
50. Gotshalk, L. A. *et al.* Creatine supplementation improves muscular performance in older women. *Eur. J. Appl. Physiol.* 102, 223–31 (2008).
51. Tarnopolsky, M. *et al.* Creatine monohydrate and conjugated linoleic acid improve strength and body composition following resistance exercise in older adults. *PLoS One* 2, e991 (2007).
52. Hass, C. J., Collins, M. A. & Juncos, J. L. Resistance training with creatine monohydrate improves upper-body strength in patients with Parkinson disease: a randomized trial. *Neurorehabil. Neural Repair* 21, 107–15 (2007).
53. Berman, S., Venembre, P., Sachet, C., Valour, S. & Dolisi, C. Effects of creatine monohydrate ingestion in sedentary and weight-trained older adults. *Acta Physiol. Scand.* 164, 147–55 (1998).
54. Wiroth, J. B. *et al.* Effects of oral creatine supplementation on maximal pedalling performance in older adults. *Eur. J. Appl. Physiol.* 84, 533–9 (2001).
55. Ruda MYa, Samarenko, M. B., Afonskaya, N. I. & Saks, V. A. Reduction of ventricular arrhythmias by phosphocreatine (Neoton) in patients with acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 116, 393–397 (1988).
56. Zervou, S., Whittington, H. J., Russell, A. J. & Lygate, C. A. Augmentation of Creatine in the Heart. *Mini Rev. Med. Chem.* 16, 19–28 (2016).
57. Horjus, D. L., Oudman, I., van Montfrans, G. A. & Brewster, L. M. Creatine and creatine analogues in hypertension and cardiovascular disease. *Cochrane database Syst. Rev.* CD005184 (2011).
58. Ye, Y., Gong, G., Ochiai, K., Liu, J. & Zhang, J. High-energy phosphate metabolism and creatine kinase in failing hearts: a new porcine model. *Circulation* 103, 1570–1576 (2001).
59. Nascimben, L. *et al.* Enalapril treatment increases cardiac performance and energy reserve via the creatine kinase reaction in myocardium of Syrian myopathic hamsters with advanced heart failure. *Circulation* 91, 1824–1833 (1995).
60. Neubauer, S. The failing heart—an engine out of fuel. *N. Engl. J. Med.* 356, 1140–1151 (2007).
61. Neubauer, S. *et al.* Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 96, 2190–2196 (1997).
62. Neubauer, S. *et al.* Impairment of energy metabolism in intact residual myocardium of rat hearts with chronic myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* 95, 1092–1100 (1995).
63. Smith, S. H., Kramer, M. F., Reis, I., Bishop, S. P. & Ingwall, J. S. Regional changes in creatine kinase and myocyte size in hypertensive and nonhypertensive cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 67, 1334–44 (1990).
64. Landoni, G. *et al.* Cardiac protection with phosphocreatine: a meta-analysis. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 23, 637–646 (2016).
65. Deutekom, M., Beltman, J. G., de Ruiter, C. J., de Koning, J. J. & de Haan, A. No acute effects of short-term creatine supplementation on muscle properties and sprint performance. *Eur. J. Appl. Physiol.* 82, 223–9 (2000).
66. Guzun, R. *et al.* Modular organization of cardiac energy metabolism: energy conversion, transfer and feedback regulation. *Acta Physiol.* 213, 84–106 (2015).
67. Saks, V. *et al.* Intracellular Energetic Units regulate metabolism in cardiac cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 419–436 (2012).
68. Kushmerick, M. J. & Conley, K. E. Energetics of muscle contraction: the whole is less than the sum of its parts. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 227–31 (2002).

69. Kushmerick, M. J. Energy balance in muscle activity: simulations of ATPase coupled to oxidative phosphorylation and to creatine kinase. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 120, 109–23 (1998).
70. Meyer, R. A., Sweeney, H. L. & Kushmerick, M. J. A simple analysis of the ‘phosphocreatine shuttle’. *Am. J. Physiol.* 246, C365–77 (1984).
71. Carrasco, A. J. *et al.* Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 7623–7628 (2001).
72. Bittl, J. A. & Ingwall, J. S. Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A ³¹P NMR magnetization transfer study. *J. Biol. Chem.* 260, 3512–7 (1985).
73. Nishiki, K., Erecińska, M. & Wilson, D. F. Energy relationships between cytosolic metabolism and mitochondrial respiration in rat heart. *Am. J. Physiol.* 234, C73–81 (1978).
74. Kushmerick, M. J. & Davies, R. E. The chemical energetics of muscle contraction. II. The chemistry, efficiency and power of maximally working sartorius muscles. Appendix. Free energy and enthalpy of atp hydrolysis in the sarcoplasm. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 174, 315–53 (1969).
75. Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. & Eppenberger, H. M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 281 (Pt 1, 21–40 (1992).
76. Thorn, J. A. & Jarvis, S. M. Adenosine transporters. *Gen. Pharmacol.* 27, 613–620 (1996).
77. Tawfik, H. E., Schnermann, J., Oldenburg, P. J. & Mustafa, S. J. Role of A1 adenosine receptors in regulation of vascular tone. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H1411–6 (2005).
78. Berne, R. M. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ. Res.* 47, 807–13 (1980).
79. Deussen, A., Brand, M., Pexa, A. & Weichsel, J. Metabolic coronary flow regulation--current concepts. *Basic Res. Cardiol.* 101, 453–64 (2006).
80. Hori, M. & Kitakaze, M. Adenosine, the heart, and coronary circulation. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* 18, 565–74 (1991).
81. Tune, J. D., Gorman, M. W. & Feigl, E. O. Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *J. Appl. Physiol.* 97, 404–415 (2004).
82. Waxman, M. B. & Asta, J. A. Role of adenosine receptors in the paradoxical bradycardia response of rats to inferior vena cava occlusion during an infusion of isoproterenol. *Circulation* 98, 1228–1235 (1998).
83. Jornayvaz, F. R. & Shulman, G. I. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 47, 69–84 (2010).
84. Liu, S., Reilly, S. M. & Lee, C.-H. Transcriptional repression of mitochondrial function in aging: a novel role for the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors co-repressor. *Antioxidants {&} redox Signal.* 19, 299–309 (2013).
85. Bremer, K., Kocha, K. M., Snider, T. & Moyes, C. D. Sensing and responding to energetic stress: The role of the AMPK-PGC1 α -NRF1 axis in control of mitochondrial biogenesis in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 199, 4–12 (2016).
86. Villanueva-Paz, M. *et al.* AMPK Regulation of Cell Growth, Apoptosis, Autophagy, and Bioenergetics. *EXS* 107, 45–71 (2016).
87. Gregor, M., Janovská, A., Stefl, B., Zurmanová, J. & Mejsnar, J. Substrate channelling in a creatine kinase system of rat skeletal muscle under various pH conditions. *Exp. Physiol.* 88, (2003).
88. Kolar, D. *et al.* Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult. *Mol. Cell. Biochem.* (2017).
89. Ingwall, J. S. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc. Res.* 81, 412–419 (2008).
90. Wilson, J. E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 206, 2049–2057 (2003).
91. Kottke, M., Adams, V., Wallimann, T., Nalam, V. K. & Brdiczka, D. Location and regulation of octameric mitochondrial creatine kinase in the contact sites. *Biochim. Biophys. Acta* 1061, 215–25 (1991).
92. Brdiczka, D. G., Zorov, D. B. & Sheu, S.-S. Mitochondrial contact sites: Their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1762, 148–163 (2006).
93. Jacobus, W. E. & Saks, V. A. Creatine kinase of heart mitochondria: changes in its kinetic properties induced by coupling to oxidative phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 219, 167–78 (1982).

94. Dolder, M., Wendt, S. & Wallimann, T. Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol. Signals Recept.* 10, 93–111
95. Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R. A. & Wallimann, T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 119–66 (1992).
96. Schlattner, U., Dolder, M., Wallimann, T. & Tokarska-Schlattner, M. Mitochondrial Creatine Kinase and Mitochondrial Outer Membrane Porin Show a Direct Interaction That Is Modulated by Calcium. *J. Biol. Chem.* 276, 48027–48030 (2001).
97. Vyssokikh, M. Y. & Brdiczka, D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim. Pol.* 50, 389–404 (2003).
98. Datler, C. *et al.* CKMT1 regulates the mitochondrial permeability transition pore in a process that provides evidence for alternative forms of the complex. *J. Cell Sci.* 127, 1816–28 (2014).
99. Jacobus, W. E. & Lehninger, A. L. Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J. Biol. Chem.* 248, 4803–10 (1973).
100. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. & Starkov, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15–8 (1997).
101. Saks, V. A., Ventura-Clapier, R. & Aliev, M. K. Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1274, 81–8 (1996).
102. Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F. & Vercesi, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 495, 12–5 (2001).
103. Briston, T. *et al.* Mitochondrial permeability transition pore: sensitivity to opening and mechanistic dependence on substrate availability. *Sci. Rep.* 7, 10492 (2017).
104. Saks, V. A., Belikova, Y. O. & Kuznetsov, A. V. In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim. Biophys. Acta* 1074, 302–11 (1991).
105. Ventura-Clapier, R., Veksler, V. & Hoerter, J. A. Myofibrillar creatine kinase and cardiac contraction. *Mol. Cell. Biochem.* 133–134, 125–44
106. Hettling, H. & van Beek, J. H. G. M. Analyzing the functional properties of the creatine kinase system with multiscale ‘sloppy’ modeling. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002130 (2011).
107. Wallimann, T., Pelloni, G., Turner, D. C. & Eppenberger, H. M. Monovalent antibodies against MM-creatine kinase remove the M line from myofibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4296–300 (1978).
108. Stolz, M. & Wallimann, T. Myofibrillar interaction of cytosolic creatine kinase (CK) isoenzymes: allocation of N-terminal binding epitope in MM-CK and BB-CK. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 9, 1207–16 (1998).
109. Turner, D. C., Wallimann, T. & Eppenberger, H. M. A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 702–5 (1973).
110. Wallimann, T., Kuhn, H. J., Pelloni, G., Turner, D. C. & Eppenberger, H. M. Localization of creatine kinase isoenzymes in myofibrils. II. Chicken heart muscle. *J. Cell Biol.* 75, 318–25 (1977).
111. Kraft, T. *et al.* Equilibration and exchange of fluorescently labeled molecules in skinned skeletal muscle fibers visualized by confocal microscopy. *Biophys. J.* 69, 1246–1258 (1995).
112. Ventura-Clapier, R., Saks, V. A., Vassort, G., Lauer, C. & Elizarova, G. V. Reversible MM-creatine kinase binding to cardiac myofibrils. *Am. J. Physiol.* 253, C444-55 (1987).
113. Saks, V. A., Ventura-Clapier, R., Huchua, Z. A., Preobrazhensky, A. N. & Emelin, I. V. Creatine kinase in regulation of heart function and metabolism. I. Further evidence for compartmentation of adenine nucleotides in cardiac myofibrillar and sarcolemmal coupled ATPase-creatine kinase systems. *Biochim. Biophys. Acta* 803, 254–264 (1984).
114. Kraft, T., Hornemann, T., Stolz, M., Nier, V. & Wallimann, T. Coupling of creatine kinase to glycolytic enzymes at the sarcomeric I-band of skeletal muscle: a biochemical study in situ. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21, 691–703 (2000).
115. Piquereau, J. *et al.* Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains. *J. Physiol.* 588, 2443–2454 (2010).

116. Theo Wallimann, M. T.-S., Dietbert Neumann, Richard M. Epand, R. F. E., Robert H. Andres, Hans Rudolf Widmer, T. H., Valdur Saks, Irina Agarkova & Schlattner, U. in *Molecular systems bioenergetics: energy for life* (ed. Saks, V.) 195–264 (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007).
117. Guerrero, M. L. *et al.* Metabolic support of Na⁺ pump in apically permeabilized A6 kidney cell epithelia: role of creatine kinase. *Am. J. Physiol.* 272, C697–706 (1997).
118. Grosse, R., Spitzer, E., Kupriyanov, V. V., Saks, V. A. & Repke, K. R. Coordinate interplay between (Na⁺ + K⁺)-ATPase and creatine phosphokinase optimizes (Na⁺/K⁺)-antiport across the membrane of vesicles formed from the plasma membrane of cardiac muscle cell. *Biochim. Biophys. Acta* 603, 142–56 (1980).
119. Yang, Y.-C. *et al.* Regulation of Sodium-Calcium Exchanger Activity by Creatine Kinase under Energy-compromised Conditions. *J. Biol. Chem.* 285, 28275–28285 (2010).
120. Abraham, M. R. *et al.* Coupling of cell energetics with membrane metabolic sensing. Integrative signaling through creatine kinase phosphotransfer disrupted by M-CK gene knock-out. *J. Biol. Chem.* 277, 24427–24434 (2002).
121. Dzeja, P. P. & Terzic, A. Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K⁺ channels. *FASEB J.* 12, 523–9 (1998).
122. Rossi, A. M., Eppenberger, H. M., Volpe, P., Cotrufo, R. & Wallimann, T. Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca²⁺ uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *J. Biol. Chem.* 265, 5258–5266 (1990).
123. Korge, P., Byrd, S. K. & Campbell, K. B. Functional coupling between sarcoplasmic-reticulum-bound creatine kinase and Ca(2+)-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 213, 973–80 (1993).
124. Agarkova, I. & Perriard, J.-C. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol.* 15, 477–485 (2005).
125. Žurmanová, J. & Soukup, T. Comparison of myosin heavy chain mRNAs, protein isoforms and fiber type proportions in the rat slow and fast muscles. *Physiol. Res.* 62, (2013).
126. Thornell, L. E., Carlsson, E., Kugelberg, E. & Grove, B. K. Myofibrillar M-band structure and composition of physiologically defined rat motor units. *Am. J. Physiol.* 253, C456–68 (1987).
127. Carlsson, E. & Thornell, L. E. Diversification of the myofibrillar M-band in rat skeletal muscle during postnatal development. *Cell Tissue Res.* 248, 169–80 (1987).
128. Strehler, E. E., Carlsson, E., Eppenberger, H. M. & Thornell, L. E. Ultrastructural localization of M-band proteins in chicken breast muscle as revealed by combined immunocytochemistry and ultramicrotomy. *J. Mol. Biol.* 166, 141–58 (1983).
129. Sjöström, M. & Squire, J. M. Fine structure of the A-band in cryo-sections. The structure of the A-band of human skeletal muscle fibres from ultra-thin cryo-sections negatively stained. *J. Mol. Biol.* 109, 49–68 (1977).
130. Hornemann, T. *et al.* Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. *J. Mol. Biol.* 332, 877–87 (2003).
131. Mejsnar, J. A., Sopko, B. & Gregor, M. Myofibrillar creatine kinase activity inferred from a 3D model. *Physiol. Res.* 51, 35–41 (2002).
132. Lahiri, S. D. *et al.* The 2.1 Å structure of *Torpedo californica* creatine kinase complexed with the ADP-Mg(2+)-NO(3)(-)-creatine transition-state analogue complex. *Biochemistry* 41, 13861–13867 (2002).
133. Srere, P. A. & Ovadi, J. Enzyme-enzyme interactions and their metabolic role. *FEBS Lett.* 268, 360–4 (1990).
134. Zala, D. *et al.* The advantage of channeling nucleotides for very processive functions. *F1000Research* 6, 724 (2017).
135. Hornemann, T., Stolz, M. & Wallimann, T. Isoenzyme-specific interaction of muscle-type creatine kinase with the sarcomeric M-line is mediated by NH(2)-terminal lysine charge-clamps. *J. Cell Biol.* 149, 1225–34 (2000).
136. Gregor, M., Kubala, M., Amler, E. & Mejsnar, J. Frequency-domain lifetime fluorometry of double-labeled creatine kinase. *Physiol. Res.* 52, 579–585 (2003).
137. Zhao, T.-J., Yan, Y.-B., Liu, Y. & Zhou, H.-M. The generation of the oxidized form of creatine kinase is a negative regulation on muscle creatine kinase. *J. Biol. Chem.* 282, 12022–9 (2007).
138. Barnes, P. R., Kemp, G. J., Taylor, D. J. & Radda, G. K. Skeletal muscle metabolism in myotonic dystrophy A 31P magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 120 (Pt 10), 1699–711 (1997).

139. Taylor, D. J., Kemp, G. J. & Radda, G. K. Bioenergetics of skeletal muscle in mitochondrial myopathy. *J. Neurol. Sci.* 127, 198–206 (1994).
140. Stolz, M., Hornemann, T., Schlattner, U. & Wallimann, T. Mutation of conserved active-site threonine residues in creatine kinase affects autophosphorylation and enzyme kinetics. *Biochem. J.* 363, 785–92 (2002).
141. Ostadal, B. & Kolar, F. Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 158, 224–236 (2007).
142. Kolár, F. & Ostádal, B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol. Res.* 53 Suppl 1, S3–13 (2004).
143. Asemu, G., Papousek, F., Ostádal, B. & Kolár, F. Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 1821–1831 (1999).
144. Neckár, J. *et al.* Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc. Res.* 55, 567–575 (2002).
145. Neckář, J. *et al.* Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol. Res.* 53, 621–628 (2004).
146. Neckár, J. *et al.* Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BKCa channels. *Curr. Pharm. Des.* 19, 6880–6889 (2013).
147. Kolár, F. *et al.* Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 292, H224–H230 (2007).
148. Shimamoto, N. *et al.* Myocardial energy metabolism in the hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats. *Basic Res. Cardiol.* 77, 359–7
149. Alvarez, M. C. *et al.* Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress? *Hypertens. Res.* 31, 1465–1476 (2008).
150. Conrad, C. H. *et al.* Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 91, 161–170 (1995).
151. Waskova-Arnostova, P. *et al.* Cardioprotective adaptation of rats to intermittent hypobaric hypoxia is accompanied by the increased association of hexokinase with mitochondria. *J. Appl. Physiol.* 119, 1487–1493 (2015).
152. Prabhakar, N. R. & Semenza, G. L. Oxygen Sensing and Homeostasis. *Physiology (Bethesda)*. 30, 340–348 (2015).
153. Mik, E. G. *et al.* Mitochondrial oxygen tension within the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 943–51 (2009).
154. Semenza, G. L. Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Pathway. *Sci. STKE* 2007, cm8-cm8 (2007).
155. Prabhakar, N. R. & Semenza, G. L. Regulation of carotid body oxygen sensing by hypoxia-inducible factors. *Pflugers Arch.* 468, 71–75 (2016).
156. Glover, L. E. *et al.* Control of creatine metabolism by HIF is an endogenous mechanism of barrier regulation in colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 19820–19825 (2013).
157. Santacruz, L. *et al.* Hypoxia decreases creatine uptake in cardiomyocytes, while creatine supplementation enhances HIF activation. *Physiol. Rep.* 5, e13382 (2017).
158. Jezková, J. *et al.* Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* 232, 49–56 (2002).
159. Essop, M. F. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J. Physiol.* 584, 715–726 (2007).
160. McCarthy, J., Lochner, A., Opie, L. H., Sack, M. N. & Essop, M. F. PKCε promotes cardiac mitochondrial and metabolic adaptation to chronic hypobaric hypoxia by GSK3β inhibition. *J. Cell. Physiol.* 226, 2457–68 (2011).
161. Davis, R. L., Weintraub, H. & Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000 (1987).
162. Buskin, J. N. & Hauschka, S. D. Identification of a myocyte nuclear factor that binds to the muscle-specific enhancer of the mouse muscle creatine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2627–2640 (1989).
163. Hobson, G. M., Molloy, G. R. & Benfield, P. A. Identification of cis-acting regulatory elements in the promoter region of the rat brain creatine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6533–6543 (1990).

164. Lassar, A. B. *et al.* MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58, 823–831 (1989).
165. Shen, W. *et al.* Expression of creatine kinase isoenzyme genes during postnatal development of rat brain cerebellum: evidence for transcriptional regulation. *Biochem. J.* 367, 369–380 (2002).
166. Hammerschmidt, S. *et al.* Acute changes of myocardial creatine kinase gene expression under beta-adrenergic stimulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1502, 471–80 (2000).
167. Willis, D., Zhang, Y. & Molloy, G. R. Transcription of brain creatine kinase in U87-MG glioblastoma is modulated by factor AP2. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1728, 18–33 (2005).
168. Wu-Peng, X. S., Pugliese, T. E., Dickerman, H. W. & Pentecost, B. T. Delineation of sites mediating estrogen regulation of the rat creatine kinase B gene. *Mol. Endocrinol.* 6, 231–40 (1992).
169. Pissarek, M., Bigard, X., Mateo, P., Guezennec, C. Y. & Hoerter, J. A. Adaptation of cardiac myosin and creatine kinase to chronic hypoxia: role of anorexia and hypertension. *Am. J. Physiol.* 272, H1690–5 (1997).
170. Tsika, R. W., Hauschka, S. D. & Gao, L. M-creatine kinase gene expression in mechanically overloaded skeletal muscle of transgenic mice. *Am. J. Physiol.* 269, C665-74 (1995).
171. Mehta, H. B., Popovich, B. K. & Dillmann, W. H. Ischemia induces changes in the level of mRNAs coding for stress protein 71 and creatine kinase M. *Circ. Res.* 63, 512–7 (1988).
172. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open source platform for biological image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682 (2012).
173. Pauletto, P. *et al.* Changes in ventricular creatine-kinase with progression and regression of cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *J. Hypertens. Suppl.* 7, S94-5 (1989).
174. Schoenauer, R. *et al.* EH-myomesin splice isoform is a novel marker for dilated cardiomyopathy. *Basic Res. Cardiol.* 106, 233–47 (2011).
175. Schlattner, U. *et al.* Cellular compartmentation of energy metabolism: creatine kinase microcompartments and recruitment of B-type creatine kinase to specific subcellular sites. *Amino Acids* 48, 1751–1774 (2016).
176. Miller, K., Halow, J. & Koretsky, A. P. Phosphocreatine protects transgenic mouse liver expressing creatine kinase from hypoxia and ischemia. *Am. J. Physiol.* 265, C1544-51 (1993).
177. Lin, G., Liu, Y. & MacLeod, K. M. Regulation of muscle creatine kinase by phosphorylation in normal and diabetic hearts. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 135–44 (2009).
178. Chida, K., Tsunenaga, M., Kasahara, K., Kohno, Y. & Kuroki, T. Regulation of creatine phosphokinase B activity by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 346–50 (1990).
179. Hemmer, W., Riesinger, I., Wallimann, T., Eppenberger, H. M. & Quest, A. F. Brain-type creatine kinase in photoreceptor cell outer segments: role of a phosphocreatine circuit in outer segment energy metabolism and phototransduction. *J. Cell Sci.* 106 (Pt 2, 671–83 (1993).
180. Mekhfi, H. *et al.* Creatine kinase is the main target of reactive oxygen species in cardiac myofibrils. *Circ. Res.* 78, 1016–27 (1996).
181. Holzerová, K. *et al.* Involvement of PKCepsilon in cardioprotection induced by adaptation to chronic continuous hypoxia. *Physiol. Res.* 64, 191–201 (2015).
182. Bárdos, J. I. & Ashcroft, M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim. Biophys. Acta* 1755, 107–120 (2005).
183. Jürgensen, J. S. *et al.* Persistent induction of HIF-1alpha and -2alpha in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium. *FASEB J.* 18, 1415–1417 (2004).
184. Ameln, H. *et al.* Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle. *FASEB J.* 19, 1009–1011 (2005).
185. Alánová, P. *et al.* Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 122, 1452–1461 (2017).
186. Cai, Z., Luo, W., Zhan, H. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17462–17467 (2013).
187. Tekin, D., Dursun, A. D. & Xi, L. Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 1085–1094 (2010).
188. Vega, R. B., Konhilas, J. P., Kelly, D. P. & Leinwand, L. A. Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Adaptation to Exercise. *Cell Metab.* 25, 1012–1026 (2017).

189. Borges, J. P. & Lessa, M. A. Mechanisms Involved in Exercise-Induced Cardioprotection: A Systematic Review. *Arq. Bras. Cardiol.* 105, 71–81 (2015).
190. Alánová, P. *et al.* Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 122, 1452–1461 (2017).
191. Robador, P. A. *et al.* HIF-1-mediated up-regulation of cardiotrophin-1 is involved in the survival response of cardiomyocytes to hypoxia. *Cardiovasc. Res.* 92, 247–255 (2011).
192. Wu, J. *et al.* HIF-1 α in heart: protective mechanisms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305, H821-8 (2013).
193. Hyvärinen, J. *et al.* Hearts of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase-2 hypomorphic mice show protection against acute ischemia-reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* 285, 13646–13657 (2010).
194. Loor, G. & Schumacker, P. T. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion. *Cell Death Differ.* 15, 686–690 (2008).
195. Kasparova, D. *et al.* Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems. *Physiol. Genomics* 47, physiolgenomics.00058.2015 (2015).
196. Prabhakar, N. R. & Semenza, G. L. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol. Rev.* 92, 967–1003 (2012).
197. Wenger, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 16, 1151–62 (2002).
198. Michiels, C. *et al.* HIF-1 and AP-1 Cooperate to Increase Gene Expression in Hypoxia: Role of MAP Kinases. *IUBMB Life (International Union Biochem. Mol. Biol. Life)* 52, 49–53 (2001).
199. Agani, F. & Jiang, B.-H. Oxygen-independent Regulation of HIF-1: Novel Involvement of PI3K/AKT/mTOR Pathway in Cancer. *Current Cancer Drug Targets* 13, 245–251 (2013).
200. Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275 (1999).
201. Ohh, M. *et al.* Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat. Cell Biol.* 2, 423–427 (2000).
202. Lando, D. *et al.* FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes {&} Dev.* 16, 1466–1471 (2002).
203. Ehrismann, D. *et al.* Studies on the activity of the hypoxia-inducible-factor hydroxylases using an oxygen consumption assay. *Biochem. J.* 401, 227–234 (2007).
204. Koivunen, P., Hirsilä, M., Günzler, V., Kivirikko, K. I. & Myllyharju, J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J. Biol. Chem.* 279, 9899–9904 (2004).
205. Fox, S. B. *et al.* CITED4 inhibits hypoxia-activated transcription in cancer cells, and its cytoplasmic location in breast cancer is associated with elevated expression of tumor cell hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer Res.* 64, 6075–81 (2004).
206. Tang, T. T.-L. & Lasky, L. A. The forkhead transcription factor FOXO4 induces the down-regulation of hypoxia-inducible factor 1 α by a von Hippel-Lindau protein-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 30125–35 (2003).
207. Loboda, A., Jozkowicz, A. & Dulak, J. HIF-1 versus HIF-2--is one more important than the other? *Vascul. Pharmacol.* 56, 245–251 (2012).
208. Manalo, D. J. *et al.* Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659–669 (2005).
209. Zuurbier, C. J., Smeele, K. M. A. & Eerbeek, O. Mitochondrial hexokinase and cardioprotection of the intact heart. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 181–185 (2009).
210. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *EMBO J.* 36, 252–259 (2017).
211. Qin, C., Zhou, S., Xiao, Y. & Chen, L. Erythropoietin enhances mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes exposed to chronic hypoxia through Akt/eNOS signalling pathway. *Cell Biol. Int.* 38, 335–342 (2014).
212. Green, H. J., Sutton, J. R., Cymerman, A., Young, P. M. & Houston, C. S. Operation Everest II: adaptations in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 66, 2454–61 (1989).

213. Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177–185 (2006).
214. Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. & Denko, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 3, 187–97 (2006).
215. Fukuda, R. *et al.* HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. *Cell* 129, 111–122 (2007).
216. Neckár, J. *et al.* Selective replacement of mitochondrial DNA increases the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* 131, (2017).
217. Mottet, D. *et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 31277–85 (2003).
218. Osawa, H., Sutherland, C., Robey, R. B., Printz, R. L. & Granner, D. K. Analysis of the signaling pathway involved in the regulation of hexokinase II gene transcription by insulin. *J. Biol. Chem.* 271, 16690–16694 (1996).
219. Riddle, R. S. *et al.* Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549. *Am. J. Endocrinol. Metab.* 278, 407–416 (2000).
220. Nagoshi, T. *et al.* PI3K rescues the detrimental effects of chronic Akt activation in the heart during ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 115, 2128–2138 (2005).
221. Taniyama, Y. *et al.* Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 375–85 (2005).
222. Aikawa, R. *et al.* Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation* 102, 2873–2879 (2000).
223. Sussman, M. A. *et al.* Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiol. Rev.* 91, 1023–70 (2011).
224. Gude, N. *et al.* Akt promotes increased cardiomyocyte cycling and expansion of the cardiac progenitor cell population. *Circ. Res.* 99, 381–388 (2006).
225. Hausenloy, D. J., Tsang, A., Mocanu, M. M. & Yellon, D. M. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 288, H971–H976 (2004).
226. Reinartz, M., Raupach, A., Kaisers, W. & Gödecke, A. AKT1 and AKT2 induce distinct phosphorylation patterns in HL-1 cardiac myocytes. *J. Proteome Res.* 13, 4232–4245 (2014).
227. Duan, J. *et al.* Impaired cardiac function and IGF-I response in myocytes from calmodulin-diabetic mice: role of Akt and RhoA. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E366-76 (2003).
228. Miyamoto, S., Murphy, a N. & Brown, J. H. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ.* 15, 521–529 (2008).
229. Ong, S.-B. *et al.* Akt protects the heart against ischaemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial morphology. *Thromb. Haemost.* 113, 513–521 (2015).
230. Lawlor, M. A. & Alessi, D. R. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.* 114, 2903–2910 (2001).
231. DeBosch, B., Sambandam, N., Weinheimer, C., Courtois, M. & Muslin, A. J. Akt2 Regulates Cardiac Metabolism and Cardiomyocyte Survival. *J. Biol. Chem.* 281, 32841–32851 (2006).
232. Hers, I., Vincent, E. E. & Tavaré, J. M. Akt signalling in health and disease. *Cell. Signal.* 23, 1515–1527 (2011).
233. Muslin, A. J. & DeBosch, B. Role of Akt in cardiac growth and metabolism. *Novartis Found. Symp.* 274, 118-131-155-276 (2006).
234. DeBosch, B. *et al.* Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 113, 2097–2104 (2006).
235. Cho, H. *et al.* Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728–1731 (2001).
236. Sarbassov, D. D., Guertin, D. a, Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101 (2005).
237. Eramo, M. J. & Mitchell, C. A. Regulation of PtdIns(3,4,5)P3/Akt signalling by inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 240–252 (2016).
238. Yang, W.-L. *et al.* Cycles of ubiquitination and deubiquitination critically regulate growth factor-mediated activation of Akt signaling. *Sci. Signal.* 6, ra3 (2013).

239. Alessi, D. R. *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15, 6541–6551 (1996).
240. Guertin, D. A. *et al.* Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev. Cell* 11, 859–871 (2006).
241. Jacinto, E. *et al.* SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, 125–137 (2006).
242. Mora, A., Sakamoto, K., McManus, E. J. & Alessi, D. R. Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. *FEBS Lett.* 579, 3632–3638 (2005).
243. Williams, M. R. *et al.* The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr. Biol.* 10, 439–448 (2000).
244. Ravingerová, T., Matejíková, J., Neckár, J., Andelová, E. & Kolár, F. Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 297, 111–20 (2007).
245. Ravingerova, T., Matejikova, J., Pancza, D. & Kolar, F. Reduced susceptibility to ischemia-induced arrhythmias in the preconditioned rat heart is independent of PI3-kinase/Akt. *Physiol. Res.* 58, 443–7 (2009).
246. Santi, S. A. & Lee, H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 298, (2010).
247. Nederlof, R., Eerbeek, O., Hollmann, M. W., Southworth, R. & Zuurbier, C. J. Targeting hexokinase II to mitochondria to modulate energy metabolism and reduce ischaemia-reperfusion injury in heart. *British Journal of Pharmacology* 2067–2079 (2014). 248. Majewski, N. *et al.* Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol. Cell* 16, 819–830 (2004).
249. Linseman, D. A. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 24, 9993–10002 (2004).
250. Tzatsos, A. & Tschlis, P. N. Energy depletion inhibits phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling and induces apoptosis via AMP-activated protein kinase-dependent phosphorylation of IRS-1 at Ser-794. *J. Biol. Chem.* 282, 18069–18082 (2007).
251. Santi, S. A. & Lee, H. Ablation of Akt2 induces autophagy through cell cycle arrest, the downregulation of p70S6K, and the deregulation of mitochondria in MDA-MB231 cells. *PLoS One* 6, e14614 (2011).
252. Su, C.-C., Yang, J.-Y., Leu, H.-B., Chen, Y. & Wang, P. H. Mitochondrial Akt-regulated mitochondrial apoptosis signaling in cardiac muscle cells. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 302, H716–H723 (2012).
253. Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F. & Maity, A. Regulation of glut1 mRNA by Hypoxia-inducible Factor-1 Interaction Between H-ras and Hypoxia*. *J. Biol. Chem.* 276, 9519–9525 (2001).
254. Riddle, S. R. *et al.* Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L407-16 (2000).
255. Ong, S. G. *et al.* HIF-1 reduces ischaemia-reperfusion injury in the heart by targeting the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc. Res.* 104, 24–36 (2014).
256. Burcelin, R. *et al.* Regulation of glucose transporter and hexokinase II expression in tissues of diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 265, E392--401 (1993).
257. Russell, R. R., Bergeron, R., Shulman, G. I. & Young, L. H. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol.* 277, H643--H649 (1999).
258. Holmes, B. F., Kurth-Kraczek, E. J. & Winder, W. W. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J. Appl. Physiol.* 87, 1990–1995 (1999).
259. Gitenay, D. *et al.* Glucose metabolism and hexosamine pathway regulate oncogene-induced senescence. *Cell Death Dis.* 5, e1089 (2014).
260. McCommis, K. S., Douglas, D. L., Krenz, M. & Baines, C. P. Cardiac-specific Hexokinase 2 Overexpression Attenuates Hypertrophy by Increasing Pentose Phosphate Pathway Flux. *Am. Hear. Assoc.* 1–13 (2013).
261. Zimmer, H. G. The oxidative pentose phosphate pathway in the heart: regulation, physiological significance, and clinical implications. *Basic research in cardiology* 87, 303–316 (1992).

262. Wu, R. *et al.* Reduction in hexokinase II levels results in decreased cardiac function and altered remodeling after ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* 108, 60–9 (2011).
263. Wu, R. *et al.* Hexokinase II knockdown results in exaggerated cardiac hypertrophy via increased ROS production. *EMBO Mol. Med.* 4, 633–46 (2012).
264. Gürel, E. *et al.* Ischemic preconditioning affects hexokinase activity and HKII in different subcellular compartments throughout cardiac ischemia-reperfusion. *J. Appl. Physiol.* 106, 1909–1916 (2009).
265. Schindler, A. & Foley, E. Hexokinase 1 blocks apoptotic signals at the mitochondria. *Cell. Signal.* 25, 2685–2692 (2013).
266. Wyatt, E. *et al.* Regulation and Cytoprotective Role of Hexokinase III. *PLoS One* 5, e13823 (2010).
267. Rodríguez, A., De La Cera, T., Herrero, P. & Moreno, F. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 355, 625–631 (2001).
268. Wilson, J. E. An introduction to the isoenzymes of mammalian hexokinase types I-III. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 103–107 (1997).
269. Sebastian, S., Horton, J. D. & Wilson, J. E. Anabolic function of the type II isozyme of hexokinase in hepatic lipid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 886–891 (2000).
270. John, S., Weiss, J. N. & Ribalet, B. Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose. *PLoS One* 6, e17674 (2011).
271. Aubert-Foucher, E., Font, B. & Gautheron, D. C. Rabbit heart mitochondrial hexokinase: Solubilization and general properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 391–399 (1984).
272. Cui, X. *et al.* HIF1/2 α ; mediates hypoxia-induced LDHA expression in human pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 8, 24840–24852 (2017).
273. Firth, J. D., Ebert, B. L. & Ratcliffe, P. J. Hypoxic Regulation of Lactate Dehydrogenase A. *J. Biol. Chem.* 270, 21021–21027 (1995).
274. Ullah, M. S., Davies, A. J. & Halestrap, A. P. The Plasma Membrane Lactate Transporter MCT4, but Not MCT1, Is Up-regulated by Hypoxia through a HIF-1 α -dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 281, 9030–9037 (2006).
275. Hlaváčková, M. *et al.* Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart. *Mol. Cell. Biochem.* 345, 271–282 (2010).
276. Lawrence, G. M. & Trayer, I. P. The localization of hexokinase isoenzymes in red and white skeletal muscles of the rat. *Histochem. J.* 17, 353–371 (1985).
277. Southworth, R., Davey, K. a B., Warley, A. & Garlick, P. B. A reevaluation of the roles of hexokinase I and II in the heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H378–86 (2007).
278. Chiara, F. *et al.* Hexokinase II Detachment from Mitochondria Triggers Apoptosis through the Permeability Transition Pore Independent of Voltage-Dependent Anion Channels. *PLoS One* 3, e1852 (2008).
279. Russell, R. R., Mrus, J. M., Mommessin, J. I. & Taegtmeier, H. Compartmentation of hexokinase in rat heart: A critical factor for tracer kinetic analysis of myocardial glucose metabolism. *J. Clin. Invest.* 90, 1973–1977 (1992).
280. Halestrap, A. P., Pereira, G. C. & Pasdois, P. The role of hexokinase in cardioprotection - mechanism and potential for translation. *Br. J. Pharmacol.* 172, 2085–2100 (2015).
281. Santiago, A. P. S. A., Chaves, E. A., Oliveira, M. F. & Galina, A. Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie* 90, 1566–1577 (2008).
282. Anflous-Pharayra, K., Cai, Z.-J. & Craigen, W. J. VDAC1 serves as a mitochondrial binding site for hexokinase in oxidative muscles. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1767, 136–142 (2007).
283. Rosano, C. Molecular model of hexokinase binding to the outer mitochondrial membrane porin (VDAC1): Implication for the design of new cancer therapies. *Mitochondrion* 11, 513–519 (2011).
284. Shoshan-Barmatz, V., Zakar, M., Rosenthal, K. & Abu-Hamad, S. Key regions of VDAC1 functioning in apoptosis induction and regulation by hexokinase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1787, 421–430 (2009).
285. Pastorino, J. G. & Hoek, J. B. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 171–182 (2008).

286. Roberts, D. J., Tan-Sah, V. P., Smith, J. M. & Miyamoto, S. Akt phosphorylates HK-II at Thr-473 and increases mitochondrial HK-II association to protect cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 288, 23798–23806 (2013).
287. Pastorino, J. G., Shulga, N. & Hoek, J. B. Mitochondrial Binding of Hexokinase II Inhibits Bax-induced Cytochrome Release and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 7610–7618 (2002).
288. White, T. K. & Wilson, J. E. Isolation and characterization of the discrete N- and C-terminal halves of rat brain hexokinase: retention of full catalytic activity in the isolated C-terminal half. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 375–93 (1989).
289. Pasdois, P., Parker, J. E., Griffiths, E. J. & Halestrap, A. P. The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia. *Biochem. J.* 436, 493–505 (2011).
290. Boluyt, M. O., Bing, O. H. & Lakatta, E. G. The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *Eur. Heart J.* 16 Suppl N, 19–30 (1995).
291. Arnostova, P., Jedelsky, P. L., Soukup, T. & Zurmanova, J. Electrophoretic mobility of cardiac myosin heavy chain isoforms revisited: Application of MALDI TOF/TOF analysis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, (2011).
292. Schiaffino, S. & Gorza, L. [Cardiac myosins and myocardial contraction]. *G. Ital. Cardiol.* 16, 680–95 (1986).
293. Radosinska, J. *et al.* Dietary omega-3 fatty acids attenuate myocardial arrhythmogenic factors and propensity of the heart to lethal arrhythmias in a rodent model of human essential hypertension. *J. Hypertens.* 31, (2013).
294. Radošinská, J. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids affect arrhythmogenic factors and attenuate susceptibility of the heart to malignant arrhythmias in an experimental model of human essential hypertension. *Cardiol. Lett.* 23, (2014).
295. Chandel, N. S. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11715–11720 (1998).
296. Guzy, R. D. & Schumacker, P. T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* 91, 807–819 (2006).
297. Laderoute, K. R. *et al.* 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5336–5347 (2006).
298. Sun, J. Z. *et al.* Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs. *J. Clin. Invest.* 97, 562–76 (1996).
299. Vanden Hoek, T., Becker, L. B., Shao, Z. H., Li, C. Q. & Schumacker, P. T. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ. Res.* 86, 541–548 (2000).
300. Hahnova, K. *et al.* β -Adrenergic signaling in rat heart is similarly affected by continuous and intermittent normobaric hypoxia. *Gen. Physiol. Biophys.* 35, (2016).
301. Hrbasová, M. *et al.* Altered myocardial G protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery. *J. Appl. Physiol.* 94, 2423–2432 (2003).
302. Guo, H.-C. *et al.* Chronic intermittent hypobaric hypoxia protects the heart against ischemia/reperfusion injury through upregulation of antioxidant enzymes in adult guinea pigs. *Acta Pharmacol. Sin.* 30, 947–955 (2009).
303. Nakanishi, K. *et al.* Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J. Physiol.* 489 (Pt 3, 869–876 (1995).
304. Sedlak, T. W. *et al.* Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 5171–5176 (2009).
305. Woo, Y. J. *et al.* Recombinant adenovirus-mediated cardiac gene transfer of superoxide dismutase and catalase attenuates postischemic contractile dysfunction. *Circulation* 98, II255–60; discussion II260–1 (1998).
306. Jeyapaul, J. & Jaiswal, A. K. Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1433–9 (2000).
307. Hamanaka, R. B. & Chandel, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 894–899 (2009).

308. Malec, V. *et al.* HIF-1 alpha signaling is augmented during intermittent hypoxia by induction of the Nrf2 pathway in NOX1-expressing adenocarcinoma A549 cells. *Free Radic. Biol. {&} Med.* 48, 1626–1635 (2010).
309. Hansen, J. M., Watson, W. H. & Jones, D. P. Compartmentation of Nrf-2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin-1. *Toxicol. Sci.* 82, 308–317 (2004).
310. Balková, P. *et al.* N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts. *Physiol. Res.* 60, 467–474 (2011).
311. Ostádal, B. *et al.* Changes of the right and left ventricles in rats exposed to intermittent high altitude hypoxia. *Cor Vasa* 23, 111–120 (1981).
312. Chytilová, A. *et al.* Tumour necrosis factor- α contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia. *Acta Physiol.* 214, 97–108 (2015).
313. Issan, Y. *et al.* Heme oxygenase-1 induction improves cardiac function following myocardial ischemia by reducing oxidative stress. *PLoS One* 9, e92246 (2014).
314. Yet, S. F. *et al.* Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ. Res.* 89, 168–73 (2001).
315. Wang, G. *et al.* Cardioprotective and Antiapoptotic Effects of Heme Oxygenase-1 in the Failing Heart. *Circulation* 121, 1912–1925 (2010).
316. Jirkovsky, E. *et al.* Chronic anthracycline cardiotoxicity: molecular and functional analysis with focus on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and mitochondrial biogenesis pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 468–78 (2012).
317. Baranano, D. E., Rao, M., Ferris, C. D. & Snyder, S. H. Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 16093–16098 (2002).
318. Nelson, S. K., Wong, G. H. & McCord, J. M. Leukemia inhibitory factor and tumor necrosis factor induce manganese superoxide dismutase and protect rabbit hearts from reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 223–9 (1995).
319. Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1? Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274, 11549–11556 (1999).
320. Lecour, S., Rochette, L. & Opie, L. Free radicals trigger TNF?-induced cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 65, 239–243 (2005).
321. Yamashita, N. *et al.* The involvement of cytokines in the second window of ischaemic preconditioning. *Br. J. Pharmacol.* 131, 415–422 (2000).
322. Lopez-Crisosto C, Pennanen C, Vasquez-Trincado C, Morales PE, Bravo-Sagua R, Quest AFG, Chiong M, Lavandero S. Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. *Nat Rev Cardiol* 14: 342–360, 2017.
323. Ostadal, B. and Kolar, F. (2007) ‘Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects.’, *Respiratory physiology & neurobiology*, 158(2–3), pp. 224–36.

Citované Disertační práce PŘF UK

Markéta Hlaváčková; Úloha isoformů proteinkinasy C v kardioprotektivním mechanismu adaptace na chronickou hypoxii; 2012

Kristýna Holzerová; Úloha proteinkinasy C a jejich cílových proteinů v mechanismu kardioprotekce; 2016 Petra Wasková; Úloha mitochondriální kreatinkinázy a hexokinázy v mechanismech kardioprotektivního působení chronické hypoxie; 2014

Jitka Žurmanová; Myofibrilární organizace PCr/CK systému v kosterním svalu; 2007

Citované Diplomové práce PŘF UK

Tereza Blahová; Genová exprese enzymů zapojených v regulaci apoptózy v myokardu potkana - vliv chronické a akutní hypoxie; 2014

Mário Heleš; Lokalizace cytosolických izoformů kreatin kinázy a hexokinázy v hypertrofovaném srdci; 2017

David Kolář; Úloha metabolismu laktátu v ischemicko-reperfúzním poškození srdce potkana adaptovaného na chronickou hypoxii, 2013