

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra analytické chemie**

**Proteinkinasa C  $\epsilon$  a  $\delta$  v chronicky  
hypoxickém myokardu**

**Protein kinase C  $\epsilon$  and  $\delta$  in chronically hypoxic  
heart**

Rigorózní práce



**Mgr. Kristýna Kožichová**

2012

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne

Kristýna Kožichová

# OBSAH

<b>Abstrakt</b> .....	1
<b>Klíčová slova</b> .....	1
<b>Seznam zkratek</b> .....	2
<b>1 Úvod</b> .....	3
<b>2 Chronická hypoxie</b> .....	4
2.1 Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie .....	4
<b>3 PKC</b> .....	5
3.1 Struktura PKC.....	6
3.2 PKC a chronická hypoxie .....	7
3.2.1 PKC $\epsilon$ v ischemickém myokardu.....	8
3.2.2 PKC $\delta$ v ischemickém myokardu .....	9
<b>4 Cíl práce</b> .....	11
<b>5 Metodika</b> .....	12
5.1 Frakcionace a metoda Western blot.....	12
5.2 Kvantitativní imunofluorescenční mikroskopie.....	12
<b>6 Výsledky</b> .....	13
6.1 Analýza PKC $\epsilon$ metodou Western blot.....	13
6.2 Analýza PKC $\delta$ metodou Western blot.....	14
6.3 Analýza PKC $\epsilon$ a PKC $\delta$ metodou imunofluorescenční mikroskopie .....	17
<b>7 Diskuze</b> .....	19
7.1 PKC $\epsilon$ v mechanismu kardioprotekce.....	19
7.2 PKC $\delta$ v mechanismu kardioprotekce.....	20
<b>8 Závěr</b> .....	22
<b>Seznam použité literatury</b> .....	23
<b>Příloha</b> .....	30

## **Abstrakt**

Adaptace na chronickou hypoxii vyvolává kardioprotekci, která má dlouhodobé účinky. Ukázali jsme, že v mechanismu tohoto typu kardioprotekce se uplatňuje proteinkinasa C (PKC). Doposud nebylo objasněno, jaká isoforma PKC je zde zapojena, ale nejpravděpodobnějšími adepty jsou isoformy  $\epsilon$  a  $\delta$ . Cílem této studie proto bylo sledovat změny exprese a lokalizace PKC  $\epsilon$  a PKC  $\delta$  po adaptaci na chronickou hypoxii. Ukázali jsme, že adaptace na chronickou hypoxii vede k aktivaci a translokaci PKC  $\delta$  na sarkolemální a mitochondriální membránu. Z naší studie vyplývá, že PKC  $\delta$  hraje v mechanismu kardioprotekce indukované chronickou hypoxií důležitou roli.

## **Abstract**

Adaptation to chronic hypoxia confers long-term cardioprotective effects. We have shown, that protein kinase C (PKC) is involved in this cardioprotective phenotype. It has not been elucidated, which PKC isoform plays a role, but the most likely candidates are PKC  $\epsilon$  and PKC  $\delta$ . Therefore, the aim of this study was to analyze the expression and localization of PKC  $\epsilon$  and PKC  $\delta$  after the adaptation to chronic hypoxia. We have shown that adaptation to chronic hypoxia caused the activation and translocation of PKC  $\delta$  to the mitochondrial and sarcolemmal membranes. Our study suggests that PKC  $\delta$  plays an important role in the mechanism of cardioprotection induced by chronic hypoxia.

## **Klíčová slova**

Chronická hypoxie, kardioprotekce, proteinkinasa C.

## **Key words**

Chronic hypoxia, cardioprotection, protein kinase C.

## Seznam zkratek

ALDH2	aldehyddehydrogenasa 2
C1-C4	konzervativní domény 1-4
Cx43	konexin 43
Cyto	cytosol
DAG	diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
Drp1	protein spojený s fízi mitochondrií (dynamamin-related protein 1)
GSK3 $\beta$	kinasa glykogensynthasy 3 $\beta$
Homo	homogenát
IPC	ischemický preconditioning
K <sub>ATP</sub> kanály	draslíkové kanály závislé na ATP
Mikro	mikrosomální frakce
Mito	mitochondriální frakce
mitoK <sub>ATP</sub> kanály	mitochondriální draslíkové kanály závislé na ATP
MPTP	mitochondriální permeabilní tranzitní póry
Nukl	nukleárně-cytoskeletární frakce
OXPPOS	komplexy oxidační fosforylace
p-PKC $\delta$	fosforylovaná proteinkinasa C $\delta$ (Ser 643)
p-PKC $\epsilon$	fosforylovaná proteinkinasa C $\epsilon$ (Ser 729)
PARP	poly(ADP-ribose)polymerasa
Part	partikulární frakce
PB1	domény Phox a Bem1
PKC	proteinkinasa C
PS	fosfatidylserin
ROS	volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
sarkK <sub>ATP</sub> kanály	sarkolemální draslíkové kanály závislé na ATP
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
S.E.M.	střední chyba průměru
V1-V5	variabilní domény 1-5
WGA	agglutinin z pšeničných klíčků (wheat-germ agglutinin)

# 1 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění, zejména ischemická choroba srdeční, jsou navzdory pokroku v léčbě stále jednou z hlavních příčin mortality (WHO 2011). Společným znakem většiny kardiovaskulárních onemocnění je nedostatečné zásobení myokardu kyslíkem (Peart 2008). Myokard je jako typicky aerobní tkáň na nepřetržité dodávce kyslíku kriticky závislý (Zhu 2006). Pomocí vrozených adaptivních mechanismů může organismus zvýšit odolnost myokardu vůči akutnímu či chronickému nedostatku kyslíku (Kolář 2004). Nejefektivnější způsob protekce myokardu využívající tyto endogenní protektivní mechanismy reprezentuje:

- **ischemický preconditioning (IPC)**, tj. krátkodobá adaptace na sérii krátkých ischemických epizod, která vede ke zvýšení odolnosti myokardu vůči následné letální ischemii (Murry 1986)
- **dlouhodobá adaptace myokardu na stresovou zátěž, např. na chronickou hypoxii** (Kolář 2004)

Pokud však ischemie přetrvává delší dobu, dochází k ireverzibilnímu poškození myokardu až k buněčné smrti. Pro přežití buněk je proto nezbytné obnovení průtoku krve, tzv. reperfuze. Ta však paradoxně způsobuje ještě větší poškození myokardu (Budás 2007, Hearse 1990). Rozsah poškození myokardu je tak závislý nejen na době trvání ischemie, ale také na průběhu obnovení koronární cirkulace při reperfúzi (Budás 2007) a vlastní odolnosti organismu vůči nedostatku kyslíku (Peart 2008).

## 2 Chronická hypoxie

Hypoxii chápeme jako nedostatečné zásobení tělesných tkání nebo celého organismu kyslíkem, v jehož důsledku dochází k omezení činnosti příslušné tkáně. Hypoxie je výsledkem nerovnováhy mezi nabídkou kyslíku a poptávkou po něm. Může být způsobena např. snížením parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi (Ošťádal 1999), ke kterému dochází během pobytu ve vysoké nadmořské výšce. Na rozdíl od ischemie je během hypoxie zachováván koronární průtok, zásobení myokardu substráty i odstraňování odpadních produktů (např. laktát,  $H^+$  a  $K^+$ ) (Moret 1980).

Adaptace na chronickou hypoxii (na vysokou nadmořskou výšku) je spojena s řadou funkčních změn organismu. Tyto změny mohou být pozitivní, ale i negativní.

Chronická hypoxie ovlivňuje krevní cirkulaci. Krátkodobé působení zvyšuje srdeční frekvenci a minutový výdej. Mění se také orgánová distribuce krve, kyslíkem jsou přednostně zásobeny orgány důležité pro přežití organismu, zejména srdce a mozek (Moret 1980). Dlouhodobé vystavení hypoxii způsobuje zvýšení počtu erytrocytů, tudíž zvýšení koncentrace hemoglobinu, což vede k větší transportní kapacitě krve pro kyslík (Kasalický 1977, Scheel 1990).

Adaptace na chronickou hypoxii způsobuje změny v energetickém metabolismu. Zvyšuje se kapacita anaerobního metabolismu, využití glukosy (hexokinasa) a roste kapacita pro syntézu a degradaci laktátu (laktátdehydrogenasa). Na druhou stranu je snížena schopnost odbourávat mastné kyseliny (Deindl 2003). Zároveň se zvyšuje počet mitochondrií (Costa 1988), narůstá aktivita sarkolemálních ATPas a jejich afinita k ATP (Ziegelhoffer 1987).

Adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje plicní objem, aktivní povrch plic a difúzní kapacitu pro výměnu plynů (Moret 1980). Zatímco v systémové cirkulaci má chronická hypoxie vazodilatační účinky, v plicní cirkulaci má účinky vazokonstrikční (Ošťádal 2007). Důsledkem může být plicní hypertenze a vznik hypertrofie pravé srdeční komory (Kolář 1989), která může způsobit až srdeční selhání (Kolář 1991).

### 2.1 Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie

Nižší výskyt infarktu myokardu a nižší mortalita v důsledku koronárních srdečních chorob byly u lidí žijících ve vysokých nadmořských výškách popsány již v padesátých

letech minulého století (Hurtado 1960). Výsledky epidemiologických studií byly následně mnohokrát potvrzeny na experimentálně simulované hypoxii (Ošťádal 2009). Ukázalo se, že myokard je po adaptaci na hypoxii odolnější vůči všem projevům akutního ischemického poškození, což se kromě zmenšení velikosti infarktu (Neckář 2005, Ravingerová 2007) projevuje i poklesem počtu ischemických arytmií a zlepšením obnovy kontraktility myokardu během reperfúze (Neckář 2005, Xie 2005, Rafiee 2002). Na rozdíl od preconditioningu přetrvávají tyto kardioprotektivní účinky týdny až měsíce od hypoxické expozice (Cai 2003, Neckář 2004), což činí chronickou hypoxii zajímavou z hlediska terapeutického využití.

Přestože jsou poznatky o ochraně myokardu vyvolané dlouhodobým pobytem ve vysoké nadmořské výšce známy již desítky let, mechanismus tohoto jevu nebyl doposud zcela objasněn. Příčinou nejasností může být i množství používaných experimentálních modelů a protokolů. Řada studií však naznačuje možnost zapojení proteinkinasy C (PKC) (Kolář 2009), fosfatidylinositol 3-kinasy/proteinkinasy B (Ravingerová 2007), mitochondriálních draslíkových kanálů závislých na ATP (mitoK<sub>ATP</sub> kanálů) (Neckář 2002, Zhu 2003), reaktivních forem kyslíku (ROS) (Kolář 2007) a mitochondriálních permeabilních tranzitních pórů (MPTP) (Shanmuganathan 2005). Vzájemné vztahy mezi těmito komponentami však zůstávají nejasné (Costa 2008). Tato práce se bude dále zabývat úlohou PKC v kardioprotektivním účinku chronické hypoxie.

### **3 PKC**

Proteinkinasa C (EC 2.7.11.13) byla popsána Nishizukou a spol. již v roce 1977 (Inoue 1977, Takai 1977). Jedná se o rodinu příbuzných serin/threoninových kinas, které se účastní celé řady signálních drah (Steinberg 2008). Jednotlivé isoformy PKC se liší strukturou, tkáňovou distribucí, subcelulární lokalizací, způsobem aktivace a substrátovou specificitou (Mackay 2007). Díky tomu mohou být isoformy PKC zahrnuty v natolik odlišných dějích jako je diferenciacce (Cutler 1993) a proliferace (Murray 1993), apoptóza (Reyland 2009), angiogeneze (Tsopanoglou 1993), genová exprese (Huang 1990) a energetický metabolismus (Barnett 2007, Mackay 2007). PKC hraje roli v paměti a učení (Zhao 1994), alkoholové závislosti (Newton 2007), adaptaci na bolest (Zhao 2011), nádorovém bujení (Koivunen 2006), hypoxii (Kolář 2009) a preconditioningu (Otani 2008).



Isoformy PKC se nacházejí v celé řadě tkání a buněk, jejich výskyt je druhově a orgánově specifický (Webb 2000). V srdci se vyskytují zejména isoformy  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  a  $\zeta$  (Rybin 1994).

### 3.1 Struktura PKC

Rodina savčích PKC obsahuje 10 isoenzymů, které sdílejí určité strukturní znaky (obr. 1). Jsou tvořeny jediným polypeptidovým řetězcem složeným z N-koncové regulační oblasti (20-40 kDa) a C-koncové katalytické oblasti (~45 kDa) (Steinberg 2008, Newton 2010). Molekula PKC se skládá až ze 4 konzervativních domén (C1-C4), mezi kterými jsou oblasti s menší homologií – variabilní domény (V1-V5). Regulační a katalytickou část enzymu odděluje variabilní doména 3 (V3). Regulační oblast obsahuje autoinhibiční pseudosubstrátovou sekvenci a také oblasti nutné pro navázání enzymu na membránu (Steinberg 2008). Pseudosubstrátová oblast interaguje při absenci aktivátorů s vazebným místem pro substrát v katalytické oblasti enzymu, a udržuje tak enzym v neaktivním stavu. Katalytická oblast obsahuje domény nezbytné pro vazbu ATP a substrátů (Newton 1995, Webb 2000, Steinberg 2008). Pro funkci PKC je podstatná také variabilní doména 5 (V5). V5 obsahuje „*turn*“ motiv a hydrofóbní motiv, na kterých dochází k fosforylacím enzymu, které jsou důležitým prvkem regulace PKC (Steinberg 2008).

Rodinu PKC dělíme na základě rozdílné struktury N-koncové regulační oblasti, tudíž na základě odlišných požadavků na aktivátory, do tří skupin (Barnett 2007, Steinberg 2008, Duquesnes 2011):

#### 1. konvenční PKC

- **isoformy:**  $\alpha$ ,  $\beta_I$ ,  $\beta_{II}$ ,  $\gamma$
- **aktivátory:** diacylglycerol (DAG), fosfatidylserin (PS),  $Ca^{2+}$
- **struktura:** regulační oblast je tvořena doménou C1 a C2. Doména C1 obsahuje místo pro vazbu DAG a PS, doména C2 obsahuje místo pro vazbu  $Ca^{2+}$ . Katalytická oblast enzymu je tvořena doménou C3 a C4. Doména C3 obsahuje vazebné místo pro ATP, doména C4 obsahuje vazebné místo pro substrát (Duquesnes 2011).

#### 2. nové PKC

- **isoformy:**  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$
- **aktivátory:** DAG, PS

- **struktura:** na rozdíl od konvenčních PKC mají v primární struktuře domény C1 a C2 v opačném pořadí (Duquesnes 2011).

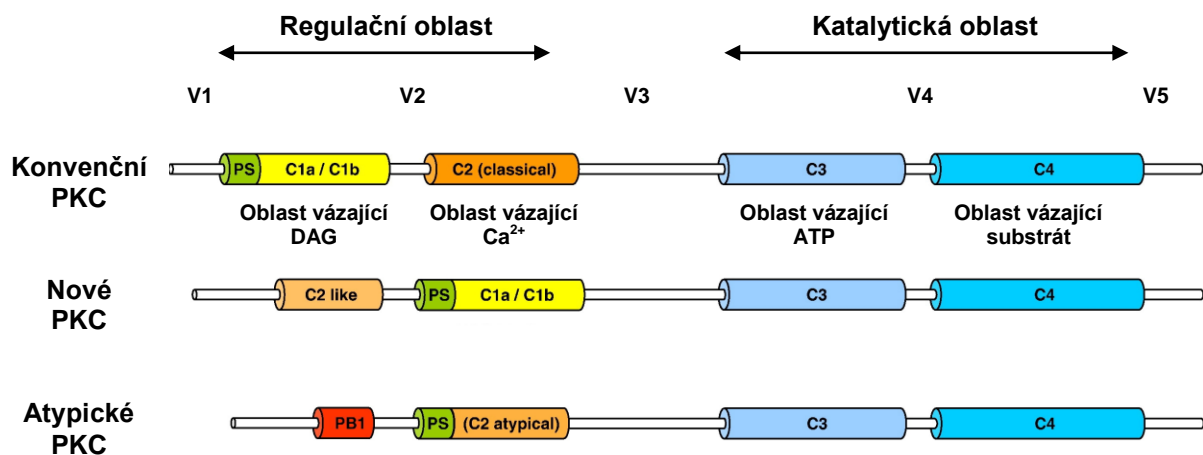
### 3. atypické PKC

- **isoformy:**  $\zeta$ ,  $\iota/\lambda$
- **aktivátory:** PS
- **struktura:** na rozdíl od konvenčních PKC neobsahují doménu C2 citlivou na  $\text{Ca}^{2+}$ , ani typickou doménu C1. Jejich atypická doména C1 neváže DAG. Obsahují doménu PB1 (Duquesnes 2011).

Poslední známou isoformou je PKC  $\mu$ . Na rozdíl od ostatních isoform PKC neobsahuje pseudosubstrátovou oblast, ale má plekstrinovou doménu (Ron 1999). Z tohoto důvodu nebývá řazena do žádné ze tří skupin PKC (Ron 1999).

#### Obr. 1: Struktura PKC

C1-C4 – konzervativní domény, DAG – diacylglycerol, PB1 – domény Phox a Bem1, PS – fosfatidylserin, V1-V5 – variabilní domény. Převzato a upraveno (Duquesnes 2011).



### 3.2 PKC a chronická hypoxie

Adaptace na chronickou hypoxii způsobuje změny relativního zastoupení specifických isoform PKC, jejich subcelulární redistribuci nebo aktivaci v myokardu levé komory. Bylo prokázáno, že obecný inhibitor PKC, chelerytrin, podaný před ischemií

kompletně ruší kardioprotektivní účinky vyvolané chronickou hypoxií a specifický inhibitor PKC  $\delta$ , rottlerin, tyto účinky částečně potlačuje (Neckář 2005).

Úlohu isoform PKC v kardioprotektivním mechanismu chronické hypoxie se doposud nepodařilo úplně objasnit. Zdá se však, že se zde uplatňují isoformy PKC  $\delta$  a PKC  $\epsilon$  (Kolář 2009). Analýzu komplikuje nejen velké množství experimentálních modelů, ale i odlišné druhy a stáří pokusných zvířat.

### 3.2.1 PKC $\epsilon$ v ischemickém myokardu

O úloze PKC  $\epsilon$  v kardioprotekci vyvolané IPC se dlouze spekulovalo. Počáteční výsledky byly kontroverzní a definitivní potvrzení přišlo až s použitím specifického antagonisty PKC  $\epsilon$  označovaného  $\epsilon V_{1-2}$  (Gray 1997), jehož podání vedlo ke zrušení kardioprotekce vyvolané IPC. Aplikace agonisty PKC  $\epsilon$   $\psi\epsilon$ RACK naopak kardioprotekci vyvolávala (Dorn 1999). Přesná úloha PKC  $\epsilon$  v mechanismu kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií však stále zůstává nejasná.

Jedním z cílů PKC  $\epsilon$  jsou MPTP. Za fyziologických podmínek se nacházejí v uzavřené konformaci, během reperfúze však dochází k jejich otevření. Vnitřní mitochondriální membrána se stane propustnou pro ionty a metabolity, dochází ke kolapsu potenciálu mitochondriální membrány a nekróze (Budás 2007). Ukázalo se, že PKC  $\epsilon$  fosforyluje MPTP, a inhibuje tak jejich otvírání (Baines 2003), čímž chrání kardiomyocyty před poškozením.

V mechanismu kardioprotektivního působení PKC  $\epsilon$  patrně hraje roli také konexin 43 (Cx43). Cx43 je hlavní složkou „*gap junctions*“ kardiomyocytů. „*Gap junctions*“ zajišťují elektrické a metabolické spojení mezi kardiomyocyty, které je nezbytné pro koordinaci funkce myokardu (van Veen 2006). Bylo prokázáno, že u Cx43 deficitních transgenních myší není možné vyvolat kardioprotekci ani farmakologickým ani ischemickým preconditioningem (Schwanke 2002, Heinzel 2005). Zároveň se ukázalo, že zvýšená tolerance vůči ischemicko-reperfúznímu poškození je spojená se zvýšenou fosforylací Cx43, kterou zprostředkovává právě PKC  $\epsilon$  (Doble 2000, Solan 2007, Srisakuldee 2009). Naopak defosforylace Cx43 způsobuje poškození myokardu (Matsushita 2006).

PKC  $\epsilon$  interaguje také s cytochrom *c* oxidasou, která je jako součást dýchacího řetězce klíčová v regulaci produkce ATP. PKC  $\epsilon$  interaguje s podjednotkou IV cytochrom *c* oxidasy, a zvyšuje tak její aktivitu (Barnett 2008).

Ukázalo se také, že PKC  $\epsilon$  aktivuje aldehyddehydrogenasu 2 (ALDH2). Tento enzym hraje důležitou roli nejen v detoxikaci reaktivních aldehydů, ale také v bioaktivaci glyceroltrinitrátu používaného při léčbě kardiovaskulárních onemocnění (Chen 2008, Churchill 2009). Bylo prokázáno, že aktivita ALDH2 pozitivně koreluje s kardioprotekcí (Chen 2008).

PKC  $\epsilon$  by mohla hrát svou roli v kardioprotekci také prostřednictvím fosforylace kinasy glykogensynthasy 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (McCarthy 2011). Tato fosforylace vede k inaktivaci GSK3 $\beta$ , dochází ke zvýšené syntéze glykogenu, snížené glykolýze a snížené produkci H<sup>+</sup> během reperfúze (McCarthy 2011).

PKC  $\epsilon$  pravděpodobně hraje úlohu i v rozvoji hypertrofie (Dorn 2005).

### **3.2.2 PKC $\delta$ v ischemickém myokardu**

Dosavadní poznatky o funkci PKC  $\delta$  v ischemicko-reperfúzním poškození a kardioprotekci jsou velmi kontroverzní. Tato isoforma může mít patrně pozitivní, ale i negativní roli, a to v závislosti na tom, jak dlouho před ischemickým podnětem dojde k její aktivaci (Kolář 2009).

Pokud je PKC  $\delta$  aktivována během reperfúze, dochází k dalšímu poškození myokardu, které je patrně způsobené zvýšenou produkcí ROS a aktivací proapoptotických drah, resp. ovlivněním rovnováhy mezi proapoptotickými a antiapoptotickými enzymy (Murriel 2004). Zvyšuje se hladina proapoptotického Bad a zároveň se snižuje hladina antiapoptotického Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub>. Dochází ke zvýšenému uvolňování cytochromu c, štěpení poly(ADP-ribosy)polymerasy (PARP) a fragmentaci DNA (Murriel 2004). Bylo prokázáno, že inhibice PKC  $\delta$  během reperfúze chrání srdce před ischemicko-reperfúzním poškozením (Sivaraman 2009).

PKC  $\delta$  také pravděpodobně interaguje s d-podjednotkou F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPasy a během dlouhotrvající ischemie způsobuje inhibici tvorby ATP, což by mohlo přispívat k ischemicko-reperfúznímu poškození zpomalením obnovy aerobní produkce ATP. Na druhou stranu by tato interakce mohla být kardioprotektivní, a to v případě inhibice reverzní reakce F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPasy prostřednictvím PKC  $\delta$  během ischemie (Nguyen 2008).

Na nervových buňkách bylo ukázáno, že při oxidačním stresu aktivuje PKC  $\delta$  dynamin-related protein 1 (Drp1) (Qi 2010). Drp1 je jedním z hlavních proteinů mitochondriální fúze. Jeho aktivace zvyšuje fragmentaci mitochondrií, čímž může přispívat

k poškození vyvolanému oxidačním stresem. Zároveň bylo zjištěno, že inhibice Drp1 chrání srdce před ischemicko-reperfúzním poškozením (Ong 2010).

Zvýšený relativní obsah PKC  $\delta$  má úlohu v rozvoji hypertrofie myokardu (Chen 2001).

Pokud je však PKC  $\delta$  aktivována dostatečně dlouho před vystavením myokardu ischemii, může fungovat i jako mediátor různých forem kardioprotekce (Kolář 2009). Inagaki a spol. ukázali, že aktivace PKC  $\delta$  dostatečně dlouho před ischemií vede k aktivaci PKC  $\epsilon$  a následné kardioprotekci (Inagaki 2005). Pozitivní úloha PKC  $\delta$  v kardioprotekci byla zároveň potvrzena i u preconditioningu. Mayr a spol. zaznamenali u PKC  $\delta$  deficitních myši ztrátu kardioprotektivních účinků standardně vyvolaných preconditioningem (Mayr 2004a). Ukázalo se také, že protektivní přechod od aerobního k anaerobnímu metabolismu, vyvolaný IPC, je podmíněn přítomností PKC  $\delta$  (Mayr 2004b).

Navíc bylo zjištěno, že PKC  $\delta$  translokuje na srdeční mitochondrie, kde fosforyluje komplex pyruvátdehydrogenasy a udržuje ho v neaktivním stavu (Budás 2007). Tím pravděpodobně přispívá k posunu od aerobního k anaerobnímu metabolismu, který je pozorován i u srdcí adaptovaných na chronickou hypoxii (Bass 1989).

Protektivní účinky PKC  $\delta$  souvisí také s aktivací mitochondriálních, a/nebo sarkolemálních  $K_{ATP}$  kanálů (mito $K_{ATP}$  sarc $K_{ATP}$  kanálů) (Kong 2001, Neckář 2002, Zhu 2003). Bylo zjištěno, že podání blokátorů mito $K_{ATP}$  a/nebo sarc $K_{ATP}$  kanálů vede k zrušení kardioprotekce vyvolané adaptací na chronickou hypoxii (Kong 2001, Neckář 2002, Zhu 2003), ale i preconditioningem (Kaneda 2008).

## 4 Cíl práce

Cílem této práce bylo sledovat úlohu isoform PKC  $\epsilon$  a PKC  $\delta$  v kardioprotektivním účinku chronické hypoxie. Po adaptaci na chronickou hypoxii bylo v myokardu levé komory potkanů kmene Wistar pomocí metod Western blot a kvantitativní imunofluorescenční mikroskopie analyzováno:

- relativní zastoupení celkové a fosforylované formy PKC  $\epsilon$  (Ser 729)
- relativní zastoupení celkové a fosforylované formy PKC  $\delta$  (Ser 643)
- efekt inhibitoru PKC  $\delta$ , rottlerinu, na relativní zastoupení PKC  $\delta$  a její detailní subcelulární distribuci

## 5 Metodika

Dospělí potkani kmene Wistar byli adaptováni na intermitentní hypobarickou hypoxii (dále v textu hypoxie, popř. chronická hypoxie). Adaptace probíhala v hypobarické komoře 8 hod/den, 5 dnů/týden, po celkovou dobu 5 týdnů. Hodnota parciálního tlaku kyslíku ( $p_{O_2} = 8,5$  kPa) v komoře odpovídala nadmořské výšce 7 000 m. Kontrolní skupina zvířat (dále v textu normoxie) byla po dobu 5 týdnů v normoxických podmínkách odpovídajících nadmořské výšce 200 m. Po adaptaci byla zvířata usmrcena a bylo jim vyjmuta srdce, které bylo následně zmrazeno v kapalném dusíku a použito k analýzám.

### 5.1 Frakcionace a metoda Western blot

Myokard levé komory byl homogenizován pod kapalným dusíkem a následně frakcionován na partikulární (Part) (100 000 x g, 60 min), nukleárně-cytoskeletární (Nukl) (1 000 x g, 10 min), mitochondriální (Mito) (8 000 x g, 10 min), mikrosomální (Mikro) (100 000 x g, 60 min) a cytosolickou frakci (Cyto). Relativní zastoupení proteinů bylo v jednotlivých frakcích stanoveno pomocí SDS-PAGE elektroforézy na polyakrylamidovém gelu, následoval přenos na nitrocelulózoové membrány a imunostanovení pomocí specifických primárních protilátek. Jednotlivé bandy byly vizualizovány metodou zesílené chemiluminiscence. Vyhodnocení bylo provedeno v programu ImageQuant.

### 5.2 Kvantitativní imunofluorescenční mikroskopie

Kryořezy (5  $\mu$ m) apexů myokardu byly inkubovány s příslušnými protilátkami a následně vizualizovány pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Pro detekci jader byl použit 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), pro mitochondrie protilátka pro komplexy oxidační fosforylace (OXPHOS) a pro sarkolemu agglutinin z pšeničných klíčků (WGA – wheat-germ agglutinin). Vyhodnocení bylo provedeno v programu SlideBook<sup>TM</sup>.

Detailní metodika viz příloha.

## 6 Výsledky

Výsledky byly převzaty z publikace Hlaváčkové a spol.: Up-regulation and redistribution of protein kinase C- $\delta$  in chronically hypoxic heart (Hlaváčková 2010) (viz příloha str. 30).

### 6.1 Analýza PKC $\epsilon$ metodou Western blot

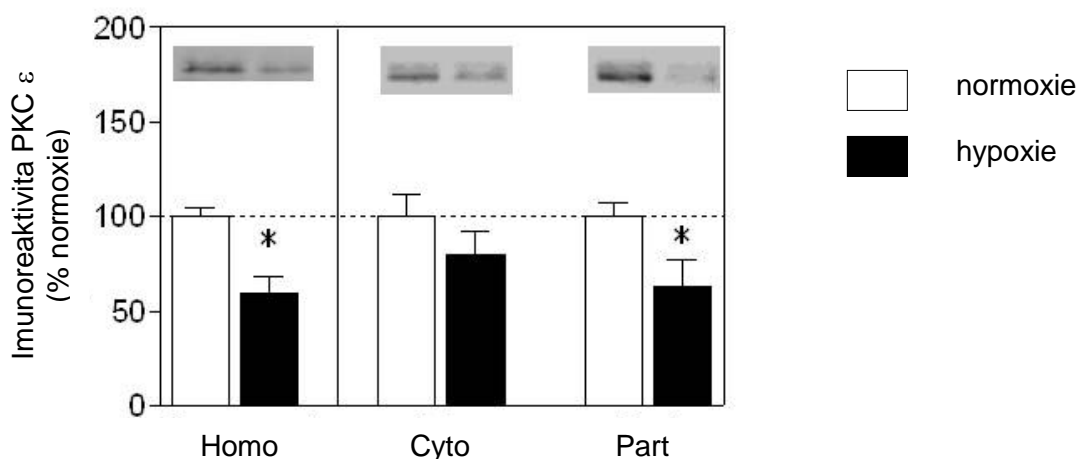
Adaptace na hypoxii vedla k poklesu PKC  $\epsilon$  v homogenátu a partikulární frakci (obr. 2A). Relativní zastoupení fosforylované formy PKC  $\epsilon$  (p-PKC  $\epsilon$ ) v homogenátu, cytosolu a partikulární frakci se po adaptaci na hypoxii nezměnilo (obr. 2B). Pokles celkové PKC  $\epsilon$  v kombinaci s neměnnou hladinou fosforylované PKC  $\epsilon$  tak u hypoxické skupiny zvířat vedl ke zvýšení poměru fosforylovaná vs. celková PKC  $\epsilon$  (obr. 2B). Podrobná analýza partikulární frakce ukázala u hypoxické skupiny pokles PKC  $\epsilon$  v mitochondriální a mikrosomální frakci (viz příloha).

#### Obr. 2A: Vliv chronické hypoxie na relativní zastoupení celkové PKC $\epsilon$ .

Cyto – cytosol, Homo – homogenát, Part – partikulární frakce. Nanášky pro PKC  $\epsilon$ : cytosol – 15  $\mu$ g, homogenát – 10  $\mu$ g, partikulární frakce – 5  $\mu$ g.

Chybové úsečky vyjadřují S.E.M., n = 5.

\* – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ( $p < 0,05$ ).



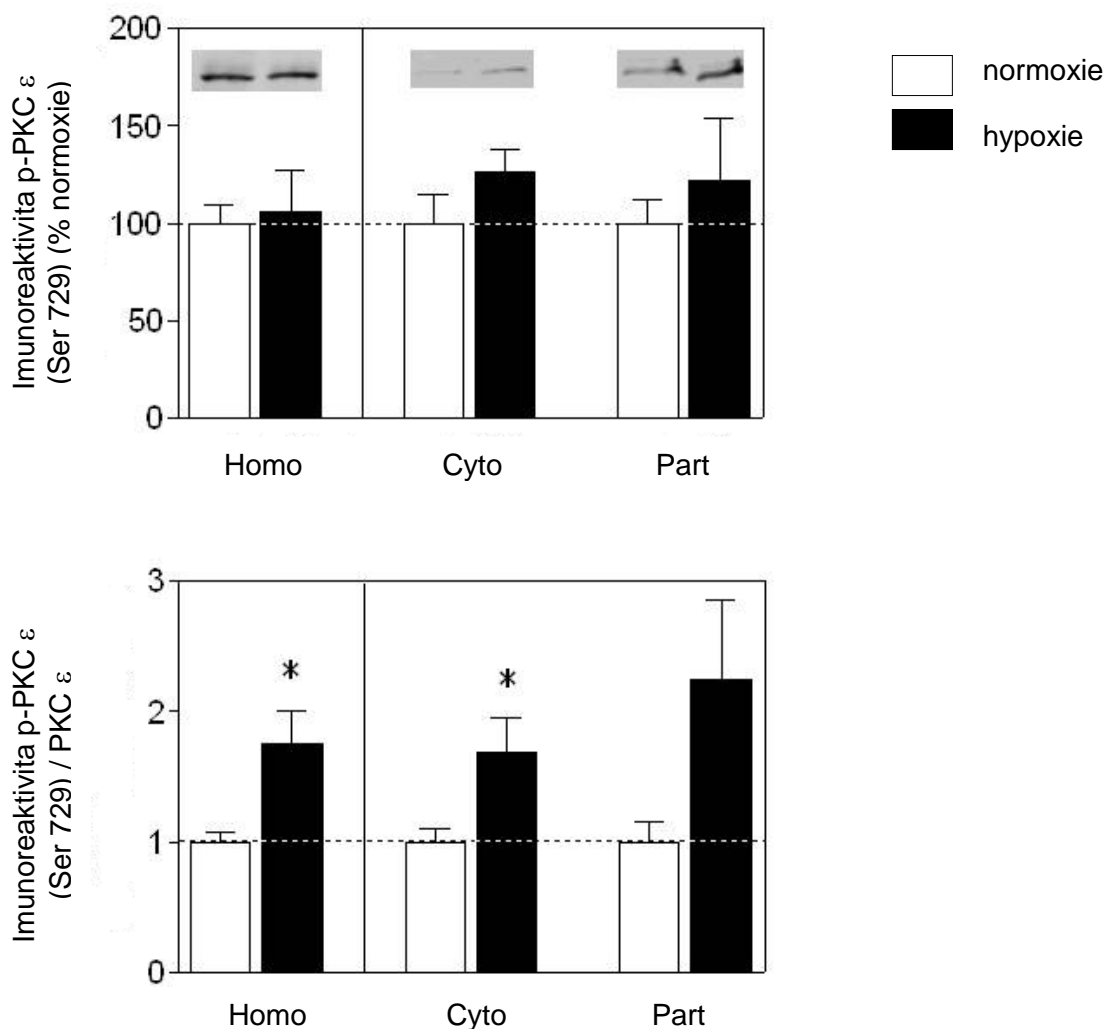


## Obr. 2B: Vliv chronické hypoxie na relativní zastoupení p-PKC $\epsilon$ (Ser 729) a poměr p-PKC $\epsilon$ (Ser 729) vs. celková PKC $\epsilon$ .

Cyto – cytosol, Homo – homogenát, Part – partikulární frakce. Nanášky pro p-PKC  $\epsilon$ : cytosol – 50  $\mu$ g, homogenát – 40  $\mu$ g, partikulární frakce – 40  $\mu$ g.

Chybové úsečky vyjadřují S.E.M., n = 5.

\* – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie (p < 0,05).



## 6.2 Analýza PKC $\delta$ metodou Western blot

Adaptace na hypoxii způsobila zvýšení celkové i fosforylované PKC  $\delta$  (p-PKC  $\delta$ ) v homogenátu, cytosolu i partikulární frakci (obr. 3A). Poměr fosforylovaná vs. celková PKC  $\delta$  se však nezměnil (obr. 3B). Podání inhibitoru PKC  $\delta$ , rottlerinu, neovlivnilo relativní zastoupení PKC  $\delta$  v homogenátu u normoxických, ani u hypoxických potkanů (viz příloha). Analýza subcelulárních frakcí však ukázala, že po adaptaci na hypoxii dochází

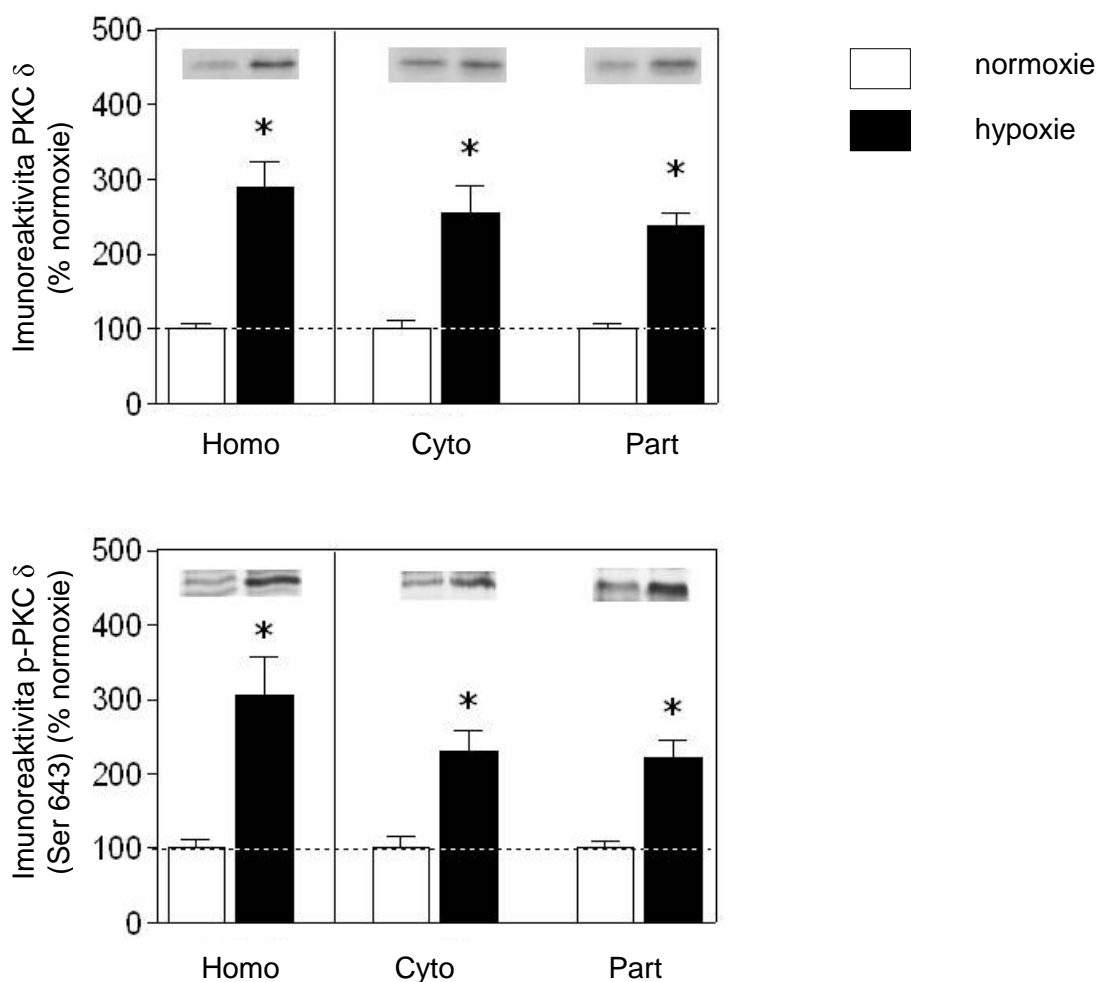
ke zvýšení PKC  $\delta$  ve všech sledovaných frakcích (obr. 4A) s největším nárůstem v mitochondriální a mikrosomální frakci. Akutní podání rottlerinu snížilo u zvířat adaptovaných na hypoxii obsah PKC  $\delta$  v mitochondriální frakci, naopak v cytosolické a nukleárně-cytoskeletární frakci došlo k nárůstu (obr. 4B).

**Obr. 3A: Vliv chronické hypoxie na relativní zastoupení celkové PKC  $\delta$  a p-PKC  $\delta$  (Ser 643).**

Cyto – cytosol, Homo – homogenát, Part – partikulární frakce. Nanášky pro PKC  $\delta$ : cytosol – 15  $\mu$ g, homogenát – 10  $\mu$ g, partikulární frakce – 5  $\mu$ g, nanášky pro p-PKC  $\delta$ : cytosol – 50  $\mu$ g, homogenát – 40  $\mu$ g, partikulární frakce – 40  $\mu$ g.

Chybové úsečky vyjadřují S.E.M., n = 6.

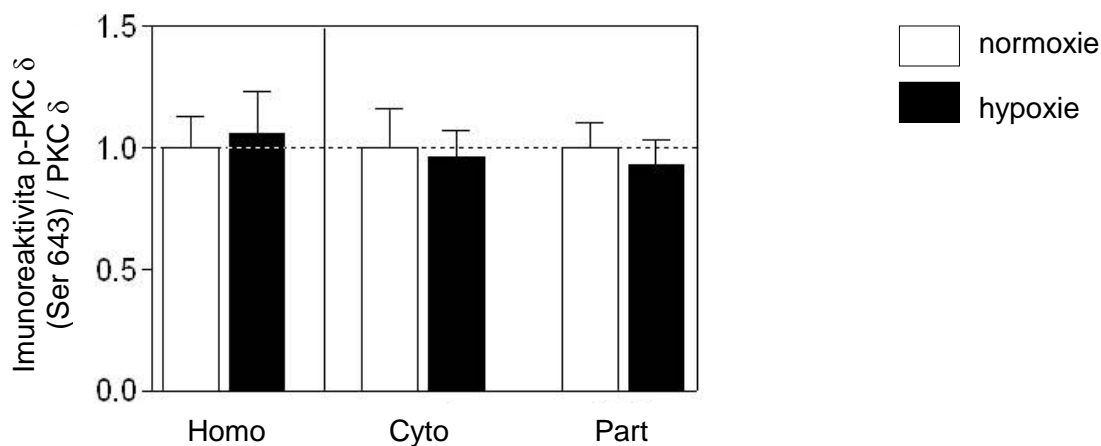
\* – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ( $p < 0,05$ ).



**Obr. 3B: Vliv chronické hypoxie na poměr p-PKC  $\delta$  (Ser 643) vs. celková PKC  $\delta$ .**

Cyto – cytosol, Homo – homogenát, Part – partikulární frakce.

Chybové úsečky vyjadřují S.E.M., n = 6.

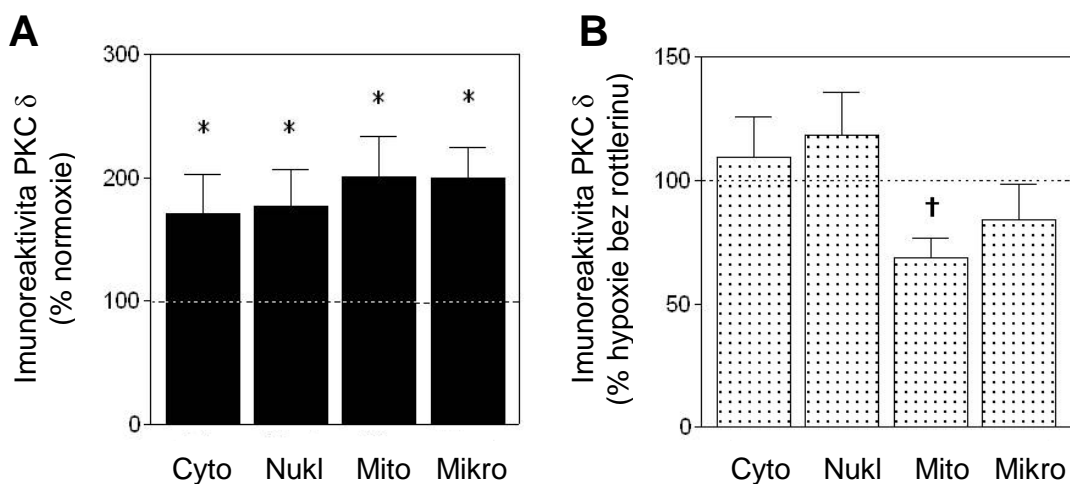


**Obr. 4: Vliv chronické hypoxie na relativní zastoupení PKC  $\delta$  v subcelulárních frakcích (4A). Vliv rottlerinu na relativní zastoupení PKC  $\delta$  v subcelulárních frakcích chronicky hypoxických potkanů (4B).**

Cyto – cytosol, Mikro – mikrosomální frakce, Mito – mitochondriální frakce, Nukl – nukleárně-cytoskeletární frakce. Nanášky pro PKC  $\delta$ : cytosol – 15  $\mu$ g, homogenát – 10  $\mu$ g, mikrosomální frakce – 5  $\mu$ g, mitochondriální frakce – 10  $\mu$ g, nukleárně-cytoskeletární frakce – 5  $\mu$ g.

Chybové úsečky vyjadřují S.E.M., n = 5.

\* – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ( $p < 0,05$ ), † – statisticky významný rozdíl hypoxie s rottlerinem vs. hypoxie bez rottlerinu ( $p < 0,05$ ).

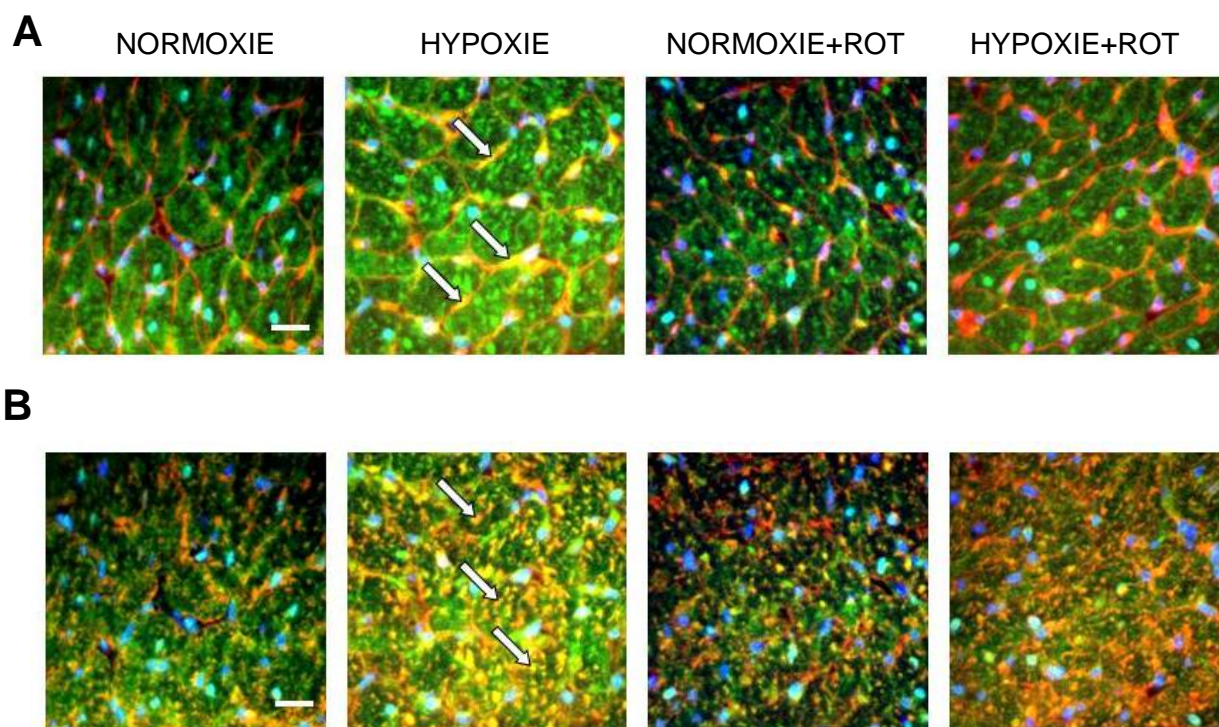


### 6.3 Analýza PKC $\epsilon$ a PKC $\delta$ metodou imunofluorescenční mikroskopie

Pomocí imunofluorescenční analýzy jsme zaznamenali kolokalizaci PKC  $\delta$  s jádrem u normoxických i hypoxických srdcí (5A, 6). Adaptace na hypoxii vyvolala redistribuci PKC  $\delta$  a zvýšenou kolokalizaci PKC  $\delta$  se sarkolemou (5A, 6) a mitochondriemi (5B, 6). Podání rottlerinu inhibovalo přesun PKC  $\delta$  na sarkolemu (5A, 6). Hypoxie vedla ke zvýšené kolokalizaci PKC  $\delta$  s mitochondriemi, kterou potlačilo podání rottlerinu (5B, 6). V normoxické skupině rottlerin distribuci PKC  $\delta$  neovlivnil (5B, 6). U PKC  $\epsilon$  jsme pozorovali částečnou kolokalizaci s mitochondriemi. Hypoxie ani rottlerin distribuci PKC  $\epsilon$  neovlivnily (obr. neuveden).

#### Obr. 5: Distribuce a kolokalizace PKC $\delta$ se sarkolemou (5A) a mitochondriemi (5B) v normoxických a hypoxických srdcích.

Zelený signál – PKC  $\delta$ , modrý signál – jádra, 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), červený signál – sarkolemální glykokalyx, agglutinin z pšeničných klíčků (WGA) (5A); mitochondrie, komplexy oxidační fosforylace (OXPHOS) (5B).

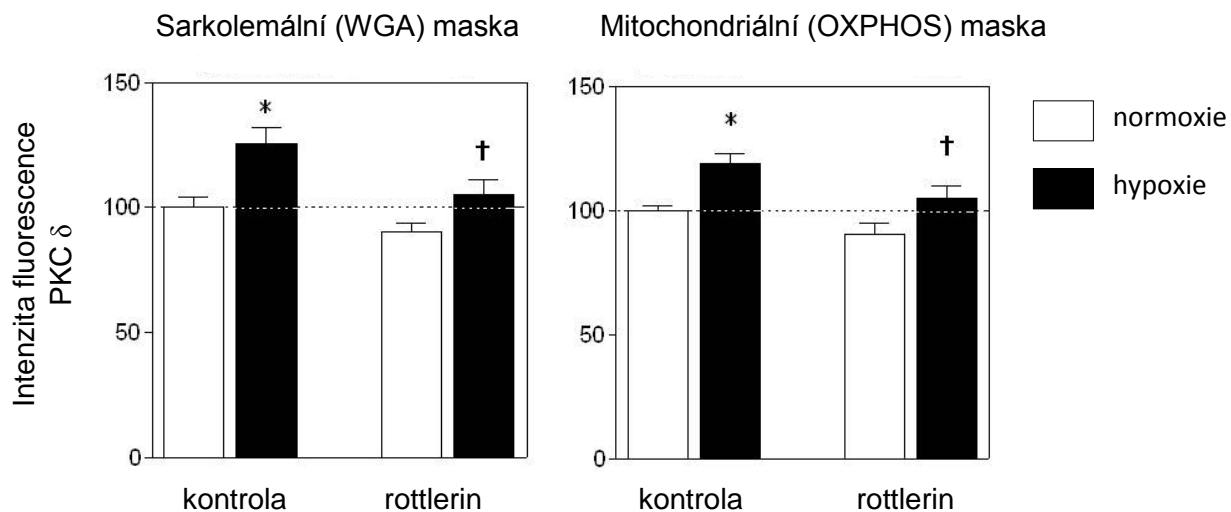


**Obr. 6: Intenzita fluorescence PKC  $\delta$  v sarkolemě (WGA) a mitochondriích (OXPHOS) u normoxických a hypoxických potkanů.**

OXPHOS – komplexy oxidační fosforylace, WGA – agglutinin z pšeničných klíčků.

Chybové úsečky vyjadřují S.E.M., n = 3.

\* – statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ( $p < 0,05$ ), † – statisticky významný rozdíl hypoxie s rottlerinem vs. hypoxie bez rottlerinu ( $p < 0,05$ ).



## 7 Diskuze

Adaptace na chronickou hypoxii, která má kardioprotektivní účinky (Rafiee 2002, Neckář 2005, Xie 2005), způsobila v myokardu levé komory potkanů nárůst relativního zastoupení PKC  $\delta$ , který byl spojen se zvýšenou fosforylací na Ser 643 a zvýšenou kolokalizací PKC  $\delta$  s mitochondriemi a sarkolemou. Specifický inhibitor PKC  $\delta$ , rottlerin, potlačil změny v subcelulární redistribuci PKC  $\delta$  pozorované u hypoxicky adaptovaných zvířat. Adaptace na hypoxii způsobila snížení celkového zastoupení PKC  $\epsilon$  a neovlivnila distribuci ani relativní zastoupení fosforylované PKC  $\epsilon$  (Ser 729).

### 7.1 PKC $\epsilon$ v mechanismu kardioprotekce

Zatímco úloha PKC  $\epsilon$  v mechanismu různých forem preconditioningu byla opakovaně potvrzena (Gray 1997, Dorn 1999), její role v kardioprotekci vyvolané chronickou hypoxií je stále sporná. V této studii jsme stejně jako v naší předchozí studii (Hlaváčková 2007) pozorovali pokles relativního zastoupení PKC  $\epsilon$  v homogenátu a partikulární frakci. Pokles obsahu PKC  $\epsilon$  v homogenátu zaznamenali i Li a spol. (Li 2004) na modelu kontinuální normobarické hypoxie (24 hod/den, 7 týdnů, 10 % O<sub>2</sub>). Na druhou stranu Ding a spol. (Ding 2004) pozorovali v myokardu po adaptaci na mírnější stupeň hypobarické hypoxie (6 hod/den, 6 týdnů, 5 000 m) zvýšení relativního zastoupení PKC  $\epsilon$  v partikulární frakci. Příčinou kontroverzních výsledků by mohlo být použití odlišných modelů hypoxie. Modely se liší intenzitou hypoxie (nadmořská výška, popř. obsah kyslíku), typem komor (normobarická  $\times$  hypobarická), ale také délkou adaptace a frekvencí případných reoxygenačních period.

Analýza fosforylované formy PKC  $\epsilon$  ukázala, že po adaptaci na hypoxii nedošlo k žádným změnám relativního zastoupení v homogenátu, cytosolu ani partikulární frakci. Vzhledem k poklesu celkové PKC  $\epsilon$  se však zvýšil poměr fosforylovaná vs. celková forma PKC  $\epsilon$ . Po adaptaci na hypoxii si tedy myokard udržuje stejnou úroveň fosforylované (aktivní) PKC  $\epsilon$  jako u kontrolních zvířat. Zapojení této isoformy v kardioprotekci vyvolané hypoxií proto nemůžeme zcela vyloučit.

## 7.2 PKC $\delta$ v mechanismu kardioprotekce

Adaptace na hypoxii vedla k nárůstu relativního zastoupení PKC  $\delta$  v homogenátu, cytosolu i partikulární frakci, což je v souladu s našimi předchozími studiemi (Neckář 2005, Hlaváčková 2007, Kolář 2007). Zvýšení relativního zastoupení PKC  $\delta$  v partikulární frakci po adaptaci na mírnější stupeň hypobarické hypoxie (6 hod/den, 6 týdnů, 5 000 m) pozorovali také Ding a spol. (Ding 2004).

Ukázali jsme, že chronická hypoxie způsobila také zvýšenou fosforylací PKC  $\delta$  na Ser 643 a zvýšenou kolokalizaci PKC  $\delta$  s mitochondriemi a sarkolemální membránou. Fosforylace PKC  $\delta$  na Ser 643 a translokace na mitochondrie byla pozorována také u kardioprotekce vyvolané farmakologickým preconditioningem (Uecker 2003). Zdá se tedy, že pozitivní úloha PKC  $\delta$  je spojena zejména s translokací PKC  $\delta$  na mitochondrie a/nebo na sarkolemu (Uecker 2003, Bouwman 2004, Hirotsani 2005, Marinovic 2005, Bouwman 2006). Zároveň bylo zjištěno, že kardioprotekce spojená s translokací PKC  $\delta$  na sarkolemální membránu je závislá na  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníku (Bouwman 2006).  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměník je klíčovým proteinem regulujícím vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do buněk. Inhibice jeho zpětného chodu snižuje translokaci PKC  $\delta$  na sarkolemu a zároveň zmenšuje kardioprotektivní účinek vyvolaný farmakologickým preconditioningem (Bouwman 2006). Zvýšená kolokalizace PKC  $\delta$  se sarkolemálními membránami by tedy v protekci myokardu vyvolané hypoxií mohla hrát svou roli.

Zjistili jsme také, že adaptace na hypoxii vede ke zvýšenému oxidačnímu stresu, který jsme dokumentovali zvýšenou tvorbou nitrotyrosinu (viz příloha). Důsledkem by mohly být změny katalytické aktivity enzymů (Pacher 2007) a ovlivnění jejich translokace (Balafanova 2002). Tyto výsledky jsou ve shodě se studií Koláře a spol., ve které se ukázalo, že zvýšené zastoupení PKC  $\delta$ , ale i kardioprotektivní účinky (snížená velikost infarktu) pozorované po adaptaci na chronickou hypoxii, jsou závislé na ROS (Kolář 2007). Chronické podávání antioxidantu během adaptace na hypoxii totiž potlačilo jak zvýšení PKC  $\delta$ , tak kardioprotektivní účinky vyvolané adaptací na hypoxii (Kolář 2007).

Podání inhibitoru PKC  $\delta$ , rottlerinu, potlačilo redistribuci PKC  $\delta$  do mitochondriální frakce pozorovanou po adaptaci na hypoxii, ale neovlivnilo celkové množství této isoformy v homogenátu. Inhibice translokace PKC  $\delta$  na mitochondrie (Fryer 2001) a na jádro (Uecker 2003) byla zaznamenána i při akutním podání rottlerinu před vystavením zvířat preconditioningu. Imunofluorescenční mikroskopická analýza ukázala, že rottlerin způsobuje částečnou blokadu hypoxií vyvolané kolokalizace PKC  $\delta$  se sarkolemou

a mitochondriemi. Tyto výsledky jsou v souladu se studií Neckáře a spol., ve které vedlo podání rottlerinu k vymizení zvýšené ischemické tolerance pozorované standardně u potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii (Neckář 2005).

Funkce PKC  $\delta$  v srdečním ischemicko-reperfúzním poškození a její přesná úloha v mechanismu kardioprotekce zůstává stále nejasná. Jednou z příčin by mohla být vysoká schopnost PKC  $\delta$  (v porovnání s ostatními isoformami) ovlivňovat odlišné buněčné funkce (Steinberg 2004). Přesné načasování aktivace PKC  $\delta$ , ale také její subcelulární lokalizace, jsou patrně kritickými faktory pro to, jestli bude mít PKC  $\delta$  protektivní nebo škodlivé účinky. Zatímco aktivace PKC  $\delta$  během reperfúze vede k apoptóze a zhoršení poškození myokardu (Inagaki 2003), aktivace PKC  $\delta$  dostatečně brzy před vlastní ischemií má naopak kardioprotektivní účinky (Inagaki 2005). Předpokládáme, že zvýšené zastoupení PKC  $\delta$  v buněčných membránách je podstatné v indukci kardioprotekce u našeho modelu chronické hypoxie.

Zdá se také, že mezi PKC  $\delta$  a PKC  $\epsilon$  dochází k vzájemné regulaci (Rybin 2003, Rybin 2007), která je v mechanismu kardioprotekce důležitá. Mayr a spol. ukázali, že inhibice PKC  $\epsilon$  má za následek kompenzační fosforylaci PKC  $\delta$  a její translokaci na mitochondrie (Mayr 2009). Ve shodě s touto hypotézou jsou i naše pozorování, kde došlo v myokardu potkanů během chronické hypoxie k nárůstu relativního zastoupení PKC  $\delta$  a translokaci PKC  $\delta$  do mitochondrií, zatímco zastoupení PKC  $\epsilon$  nebylo ovlivněno, popřípadě došlo k nepatrnému poklesu (Neckář 2005, Hlaváčková 2007, Kolář 2007).

Výsledky této studie naznačují, že PKC  $\delta$  skutečně hraje úlohu v kardioprotektivním mechanismu chronické hypoxie. Vzhledem ke kompletní inhibici kardioprotekce pomocí obecného inhibitoru PKC, chelerytrinu, a pouze částečné inhibici pomocí specifického inhibitoru PKC  $\delta$ , rottlerinu, (Neckář 2005) však nemůžeme vyloučit ani případné zapojení ostatních isoform PKC.



## 8 Závěr

Zvýšené relativní zastoupení PKC  $\delta$  v myokardu potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii je patrné zejména v sarkolemálních a mitochondriálních membránách. Podání inhibitoru PKC  $\delta$ , rottlerinu, tento přesun potlačuje a částečně ruší kardioprotekci (Neckář 2005) vyvolanou adaptací na chronickou hypoxii. Zdá se tedy, že PKC  $\delta$  v kardioprotektivním účinku chronické hypoxie hraje svou roli. Přesné porozumění signálním drahám kardioprotekce by mohlo přispět k léčbě kardiovaskulárních onemocnění.

## Seznam použité literatury

- Baines, C. P., Song, C. X., Zheng, Y. T., Wang, G. W., Zhang, J., Wang, O. L., Guo, Y., Bolli, R., Cardwell, E. M., Ping, P.: **Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria.** *Circ Res.* 92(8), 873–80 (2003).
- Balafanova, Z., Bolli, R., Zhang, J., Zheng, Y., Pass, J. M., Bhatnagar, A., Tang, X. L., Wang, O., Cardwell, E., Ping, P.: **Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon), facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon-RACK2 interactions: a novel mechanism of NO-triggered activation of PKCepsilon.** *J Biol Chem.* 277(17), 15021–7 (2002).
- Barnett, M. E., Madgwick, D. K., Takemoto, D. J.: **Protein kinase C as a stress sensor.** *Cell Signal.* 19(9), 1820–9 (2007).
- Barnett, M., Lin, D., Akoyev, V., Willard, L., Takemoto, D.: **Protein kinase C epsilon activates lens mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV during hypoxia.** *Exp Eye Res.* 86(2), 226–34 (2008).
- Bass, A., Ošťádal, B., Procházka, J., Pelouch, V., Šamánek, M., Stejskalová, M.: **Intermittent high altitude-induced changes in energy metabolism in the rat myocardium and their reversibility.** *Physiol Bohemoslov.* 38(2), 155–61 (1989).
- Bouwman, R. A., Musters, R. J. P., van Beek-Harmsen, B. J., de Lange, J. J., Boer, C.: **Reactive oxygen species precede protein kinase C-delta activation independent of adenosine triphosphate-sensitive mitochondrial channel opening in sevoflurane-induced cardioprotection.** *Anesthesiology.* 100(3), 506–14 (2004).
- Bouwman, R. A., Salic, K., Padding, F. G., Eringa, E. C., van Beek-Harmsen, B. J., Matsuda, T., Baba, A., Musters, R. J., Paulus, W. J., de Lange, J. J., Boer, C.: **Cardioprotection via activation of protein kinase C-delta depends on modulation of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger.** *Circulation.* 114, I226–32 (2006).
- Budas, G. R., Churchill, E. N., Mochly-Rosen, D.: **Cardioprotective mechanisms of PKC isoenzyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury.** *Pharmacol Res.* 55(6), 523–36 (2007).
- Cai, Z., Manalo, D. J., Wei, G., Rodriguez, E. R., Fox-Talbot, K., Lu, H., Zweier, J. L., Semenza, G. L.: **Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury.** *Circulation.* 108(1), 79–85 (2003).
- Chen, L., Hahn, H., Wu, G., Chen, C. H., Liron, T., Schechtman, D., Cavallaro, G., Banci, L., Guo, Y., Bolli, R., Dorn, G. W. 2nd, Mochly-Rosen, D.: **Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(20), 11114–9 (2001).
- Chen, C. H., Budas, G. R., Churchill, E. N., Disatnik, M. H., Hurley, T. D., Mochly-Rosen, D.: **Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart.** *Science.* 321(5895), 1493–5 (2008).

- Churchill, E. N., Disatnik, M. H., Mochly-Rosen, D.: **Time-dependent and ethanol-induced cardiac protection from ischemia mediated by mitochondrial translocation of varepsilonPKC and activation of aldehyde dehydrogenase 2.** *J Mol Cell Cardiol.* 46(2), 278–84 (2009).
- Costa, L. E., Boveris, A., Koch, O. R., Taquini, A. C.: **Liver and heart mitochondria in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia.** *Am J Physiol.* 255, C123–9 (1988).
- Costa, A. D., Garlid, K. D.: **Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295(2), H874–82 (2008).
- Cutler, R. E. Jr., Maizels, E. T., Brooks, E. J., Mizuno, K., Ohno, S., Hunzicker-Dunn, M.: **Regulation of delta protein kinase C during rat ovarian differentiation.** *Biochim Biophys Acta.* 1179(3), 260–70 (1993).
- Deindl, E., Kolář, F., Neubauer, E., Vogel, S., Schaper, W., Ošťádal, B.: **Effect of intermittent high altitude hypoxia on gene expression in rat heart and lung.** *Physiol Res.* 52(2), 147–57 (2003).
- Ding, H. L., Zhu, H. F., Dong, J. W., Zhu, W. Z., Zhou, Z. N.: **Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C.** *Life Sci.* 75(21), 2587–603 (2004).
- Doble, B. W., Ping, P., Kardami, E.: **The epsilon subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation.** *Circ Res.* 86(3), 293–301 (2000).
- Dorn, G. W. 2nd, Souroujon, M. C., Liron, T., Chen, C. H., Gray, M. O., Zhou, H. Z., Csukai, M., Wu, G., Lorenz, J. N., Mochly-Rosen, D.: **Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(22), 12798–803 (1999).
- Dorn, G. W. 2nd, Force, T.: **Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy.** *J Clin Invest.* 115(3), 527–37 (2005).
- Duquesnes, N., Lezoualc'h, F., Crozatier, B.: **PKC-delta and PKC-epsilon: foes of the same family or strangers?** *J Mol Cell Cardiol.* 51(5), 665–73 (2011).
- Fryer, R. M., Wang, Y., Hsu, A. K., Gross, G. J.: **Essential activation of PKC-delta in opioid-initiated cardioprotection.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280(3), H1346–53 (2001).
- Gray, M. O., Karlner, J. S., Mochly-Rosen, D.: **A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death.** *J Biol Chem.* 272(49), 30945–51 (1997).
- Hearse, D. J.: **Ischemia, reperfusion, and the determinants of tissue injury.** *Cardiovasc Drugs Ther.* 4, 767–76 (1990).
- Heinzel, F. R., Luo, Y., Li, X., Boengler, K., Buechert, A., García-Dorado, D., Di Lisa, F., Schulz, R., Heusch, G.: **Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice.** *Circ Res.* 97(6), 583–6 (2005).
- Hirotsani, S., Sadoshima, J.: **Preconditioning effects of PKCdelta.** *J Mol Cell Cardiol.* 39(4), 719–21 (2005).

- Hlaváčková, M., Neckář, J., Ježková, J., Balková, P., Staňková, B., Nováková, O., Kolář, F., Novák, F.: **Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia.** *Exp Biol Med.* 232(6), 823–32 (2007).
- Hlaváčková, M., Kožichová, K., Neckář, J., Kolář, F., Musters, R. J. P., Novák, F., Nováková, O.: **Up-regulation and redistribution of protein kinase C- $\delta$  in chronically hypoxic heart.** *Mol Cell Biochem.* 345(1–2), 271–82 (2010).
- Huang, K. P.: **Role of protein kinase C in cellular regulation.** *Biofactors.* 2(3), 171–8 (1990).
- Hurtado, A.: **Some clinical aspects of life at high altitudes.** *Ann Intern Med.* 53, 247–58 (1960).
- Inagaki, K., Chen, L., Ikeno, F., Lee, F. H., Imahashi, K., Bouley, D. M., Rezaee, M., Yock, P. G., Murphy, E., Mochly-Rosen, D.: **Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo.** *Circulation.* 108(19), 2304–7 (2003).
- Inagaki, K., Mochly-Rosen, D.: **DeltaPKC-mediated activation of epsilonPKC in ethanol-induced cardiac protection from ischemia.** *J Mol Cell Cardiol.* 39(2), 203–11 (2005).
- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., Nishizuka, Y.: **Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain.** *J Biol Chem.* 252(21), 7610–6 (1977).
- Kaneda, K., Miyamae, M., Sugioka, S., Okusa, C., Inamura, Y., Domae, N., Kotani, J., Figueredo, V. M.: **Sevoflurane enhances ethanol-induced cardiac preconditioning through modulation of protein kinase C, mitochondrial KATP channels, and nitric oxide synthase, in guinea pig hearts.** *Anesth Analg.* 106(1), 9–16 (2008).
- Kasalický, J., Ressler, J., Urbanová, D., Widimský, J., Ošťádal, B., Pelouch, V., Vízek, M., Procházka, J.: **Relative organ blood flow in rats exposed to intermittent high altitude hypoxia.** *Pflugers Arch.* 368(1–2), 111–5 (1977).
- Koivunen, J., Aaltonen, V., Peltonen, J.: **Protein kinase C (PKC) family in cancer progression.** *Cancer Lett.* 235(1), 1–10 (2006).
- Kolář, F., Ošťádal, B., Procházka, J., Pelouch, V., Widimský, J.: **Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats.** *Respiration.* 56(1–2), 57–62 (1989).
- Kolář, F., Ošťádal, B.: **Right ventricular function in rats with hypoxic pulmonary hypertension.** *Pflugers Arch.* 419(2), 121–6 (1991).
- Kolář, F., Ošťádal, B.: **Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia.** *Physiol Res.* 53, S3–13 (2004).
- Kolář, F., Ježková, J., Balková, P., Břeh, J., Neckář, J., Novák, F., Nováková, O., Tomášová, H., Srbová, M., Ošťádal, B., Wilhelm, J., Herget, J.: **Role of oxidative stress in PKC-delta up-regulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(1), H224–30 (2007).
- Kolář, F., Novák, F., Neckář, J., Nováková, O., Ošťádal, B., Musters, R. J. P.: **Role of protein kinases in chronic intermittent hypoxia-induced cardioprotection.** V knize: *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms To Clinical Applications.* Editors: Xi, L.; Serebrovskaya, T. Nova Science Publ., Hauppauge N.Y., ISBN: 978-1-60876-127-2; kapitola 7, 175–192 (2009).

- Kong, X., Tweddell, J. S., Gross, G. J., Baker, J. E.: **Sarcolemmal and mitochondrial K(ATP) channels mediate cardioprotection in chronically hypoxic hearts.** *J Mol Cell Cardiol.* 33(5), 1041–5 (2001).
- Li, G., Bae, S., Zhang, L.: **Effect of prenatal hypoxia on heat stress-mediated cardioprotection in adult rat heart.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(5), H1712–9 (2004).
- Mackay, H. J., Twelves, C. J.: **Targeting the protein kinase C family: are we there yet?** *Nat Rev Cancer.* 7(7), 554–62 (2007).
- Matsushita, S., Kurihara, H., Watanabe, M., Okada, T., Sakai, T., Amano, A.: **Alterations of phosphorylation state of connexin 43 during hypoxia and reoxygenation are associated with cardiac function.** *J Histochem Cytochem.* 54(3), 343–53 (2006).
- Marinovic, J., Bosnjak, Z. J., Stadnicka, A.: **Preconditioning by isoflurane induces lasting sensitization of the cardiac sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channel by a protein kinase C-delta-mediated mechanism.** *Anesthesiology.* 103(3), 540–7 (2005).
- Mayr, M., Metzler, B., Chung, Y. L., McGregor, E., Mayr, U., Troy, H., Hu, Y., Leitges, M., Pachinger, O., Griffiths, J. R., Dunn, M. J., Xu, Q.: **Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287(2), H946–56 (2004a).
- Mayr, M., Chung, Y. L., Mayr, U., McGregor, E., Troy, H., Baier, G., Leitges, M., Dunn, M. J., Griffiths, J. R., Xu, Q.: **Loss of PKC-delta alters cardiac metabolism.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287(2), H937–45 (2004b).
- Mayr, M., Liem, D., Zhang, J., Li, X., Avliyakov, N. K., Yang, J. I., Young, G., Vondriska, T. M., Ladroue, C., Madhu, B., Griffiths, J. R., Gomes, A., Xu, Q., Ping, P.: **Proteomic and metabolomic analysis of cardioprotection: Interplay between protein kinase C epsilon and delta in regulating glucose metabolism of murine hearts.** *J Mol Cell Cardiol.* 46(2), 268–77 (2009).
- McCarthy, J., Lochner, A., Opie, L. H., Sack, M. N., Essop, M. F.: **PKC $\epsilon$  promotes cardiac mitochondrial and metabolic adaptation to chronic hypobaric hypoxia by GSK3 $\beta$  inhibition.** *J Cell Physiol.* 226(9):2457–68 (2011).
- Moret, P. R.: **Hypoxia and the heart.** V knize: *Hearts and Heart-like Organs.* Editor: Bourne, G. H. Academic Press, New York, 333–87 (1980).
- Murriel, C. L., Churchill, E., Inagaki, K., Szweda, L. I., Mochly-Rosen, D.: **Protein kinase Cdelta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria.** *J Biol Chem.* 279(46), 47985–91 (2004).
- Murry, C. E., Jennings, R. B., Reimer, K. A.: **Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.** *Circulation.* 74(5), 1124–36 (1986).
- Murray, N. R., Baumgardner, G. P., Burns, D. J., Fields, A. P.: **Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that beta II protein kinase C is required for proliferation.** *J Biol Chem.* 268(21), 15847–53 (1993).
- Neckář, J., Szárszoi, O., Koten, L., Papoušek, F., Ošťádal, B., Grover, G. J., Kolář, F.: **Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats.** *Cardiovasc Res.* 55(3), 567–75 (2002).

- Neckář, J., Ošťádal, B., Kolář, F.: **Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery.** *Physiol Res.* 53(6), 621–8 (2004).
- Neckář, J., Marková, I., Novák, F., Nováková, O., Szárszoi, O., Ošťádal, B., Kolář, F.: **Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(4), H1566–72 (2005).
- Newton, A. C.: **Protein kinase C: Structure, function, and regulation.** *J Biol Chem.* 270(48), 28495–8 (1995).
- Newton, P. M., Ron, D.: **Protein kinase C and alcohol addiction.** *Pharmacol Res.* 55(6), 570–7 (2007).
- Newton, A. C.: **Protein kinase C: poised to signal.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298(3), E395–402 (2010).
- Nguyen, T., Ogbi, M., Johnson, J. A.: **Delta protein kinase C interacts with the d subunit of the F1F0 ATPase in neonatal cardiac myocytes exposed to hypoxia or phorbol ester. Implications for F1F0 ATPase regulation.** *J Biol Chem.* 283(44), 29831–40 (2008).
- Ong, S. B., Subrayan, S., Lim, S. Y., Yellon, D. M., Davidson, S. M., Hausenloy, D. J.: **Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury.** *Circulation.* 121(18), 2012–22 (2010).
- Otani, H.: **Ischemic preconditioning: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities.** *Antiox Redox Signal.* 10(2), 207–47 (2008).
- Ošťádal, B., Ošťádalová, I., Dhalla N. S.: **Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects.** *Physiol Rev.* 79(3), 635–59 (1999).
- Ošťádal, B., Kolář, F.: **Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects.** *Respir Physiol Neurobiol.* 158(2–3), 224–36 (2007).
- Ošťádal, B.: **The past, the present and the future of experimental research on myocardial ischemia and protection.** *Pharmacol Rep.* 61(1), 3–12 (2009).
- Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L.: **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.** *Physiol Rev.* 87(1), 315–424 (2007).
- Peart, J. N., Headrick, J. P.: **Sustained cardioprotection: exploring unconventional modalities.** *Vascul Pharmacol.* 49(2–3), 63–70 (2008).
- Qi, X., Disatnik, M. H., Shen, N., Sobel, R. A., Mochly-Rosen, D.: **Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C{delta} under oxidative stress conditions in vivo.** *Mol Biol Cell.* 22(2), 256–65 (2010).
- Rafiee, P., Shi, Y., Kong, X., Pritchard, K. A. Jr., Tweddell, J. S., Litwin, S. B., Mussato, K., Jaquiss, R. D., Su, J., Baker, J. E.: **Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection.** *Circulation.* 106(2), 239–45 (2002).

- Ravingerová, T., Matějíková, J., Neckář, J., Andělová, E., Kolář, F.: **Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart.** *Mol Cell Biochem.* 297(1–2), 111–20 (2007).
- Reyland, M. E.: **Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death.** *Front Biosci.* 14:2386–99 (2009).
- Ron, D., Kazanietz, M. G.: **New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors.** *Faseb J.* 13(13), 1658–76 (1999).
- Rybin, V. O., Steinberg, S. F.: **Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart.** *Circ Res.* 74(2), 299–309 (1994).
- Rybin, V. O., Sabri, A., Short, J., Braz, J. C., Molkentin, J. D., Steinberg, S. F.: **Cross-regulation of novel protein kinase C (PKC) isoform function in cardiomyocytes. Role of PKC epsilon in activation loop phosphorylations and PKC delta in hydrophobic motif phosphorylations.** *J Biol Chem.* 278(16), 14555–64 (2003).
- Rybin, V. O., Guo, J., Gertsberg, Z., Elouardighi, H., Steinberg, S. F.: **Protein kinase Cepsilon (PKCepsilon) and Src control PKCdelta activation loop phosphorylation in cardiomyocytes.** *J Biol Chem.* 282(32), 23631–8 (2007).
- Scheel, K. W., Seavey, E., Gaugl, J. F., Williams, S. E.: **Coronary and myocardial adaptations to high altitude in dogs.** *Am J Physiol.* 259, H1667–73 (1990).
- Schwanke, U., Konietzka, I., Duschin, A., Li, X., Schulz, R., Heusch, G.: **No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283(4), H1740–2 (2002).
- Shanmuganathan, S., Hausenloy, D. J., Duchon, M. R., Yellon, D. M.: **Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289(1), H237–42 (2005).
- Sivaraman, V., Hausenloy, D. J., Kolvekar, S., Hayward, M., Yap, J., Lawrence, D., Di Salvo, C., Yellon, D. M.: **The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium.** *J Mol Cell Cardiol* 46(5), 758–64 (2009).
- Solan, J. L., Marquez-Rosado, L., Sorgen, P. L., Thornton, P. J., Gafken, P. R., Lampe, P. D.: **Phosphorylation at S365 is a gatekeeper event that changes the structure of Cx43 and prevents down-regulation by PKC.** *J Cell Biol.* 179(6), 1301–9 (2007).
- Srisakuldee, W., Jeyaraman, M. M., Nickel, B. E., Tanguy, S., Jiang, Z. S., Kardami, E.: **Phosphorylation of connexin-43 at serine 262 promotes a cardiac injury-resistant state.** *Cardiovasc Res.* 83(4), 672–81 (2009).
- Steinberg S. F.: **Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta.** *Biochem J.* 384, 449–59 (2004).
- Steinberg, S. F.: **Structural basis of protein kinase C isoform function.** *Physiol Rev.* 88(4), 1341–78 (2008).

Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., Nishizuka, Y.: **Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum.** *J Biol Chem.* 252(21), 7603–9 (1977).

Tsopanoglou, N. E., Pipili-Synetos, E., Maragoudakis, M. E.: **Protein kinase C involvement in the regulation of angiogenesis.** *J Vasc Res.* 30(4), 202–8 (1993).

Uecker, M., Da Silva, R., Grampp, T., Pasch, T., Schaub, M. C., Zaugg, M.: **Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning.** *Anesthesiology.* 99(1), 138–47 (2003).

van Veen, T. A., van Rijen, H. V., Jongsma, H. J.: **Physiology of cardiovascular gap junctions.** *Adv Cardiol.* 42, 18–40 (2006).

Webb, B. L., Hirst, S. J., Giembycz, M. A.: **Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis.** *Br J Pharmacol.* 130(7), 1433–52 (2000).

World Health Organization: **WHO causes of death 2008 summary tables.** Health statistics and informatics Department, World Health Organization, Geneva, Switzerland (2011). [http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death\\_2008/en/index.html](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death_2008/en/index.html), staženo dne 1.11.2011.

Xie, Y., Zhu, Y., Zhu, W. Z., Chen, L., Zhou, Z. N., Yuan, W. J., Yang, H. T.: **Role of dual-site phospholamban phosphorylation in intermittent hypoxia-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(6), H2594–602 (2005).

Zhao, W. Q., Sedman, G. L., Gibbs, M. E., Ng, K. T.: **Effect of PKC inhibitors and activators on memory.** *Behav Brain Res.* 60(2), 151–60 (1994).

Zhao, C., Leitges, M., Gereau, R. W. 4th.: **Isozyme-specific Effects of Protein Kinase C in Pain Modulation.** *Anesthesiology.* Přípraveno k tisku (2011).

Zhu, H. F., Dong, J. W., Zhu, W. Z., Ding, H. L., Zhou, Z. N.: **ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury.** *Life Sci.* 73(10), 1275–87 (2003).

Zhu, W. Z., Xie, Y., Chen, L., Yang, H. T., Zhou, Z. N.: **Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury.** *J Mol Cell Cardiol.* 40(1), 96–106 (2006).

Ziegelhoffer, A., Procházka, J., Pelouch, V., Ošťádal, B., Dzurba, A., Vrbjar, N.: **Increased affinity to substrate in sarcolemmal ATPases from hearts acclimatized to high altitude hypoxia.** *Physiol Bohemoslov.* 36(5), 403–15 (1987).



## **Příloha**

### **Up-regulation and redistribution of protein kinase C- $\delta$ in chronically hypoxic heart.**

Hlaváčková Markéta, Kožichová Kristýna, Neckář Jan, Kolář František, Musters René J. P., Novák František, Nováková Olga.

Mol Cell Biochem. 345(1–2), 271–82 (2010).